

Versuche zur Gewinnung eines Phospholipoids aus
Wollfett
und zur Identifizierung seiner Spaltprodukte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Werner Fülberth
aus
Darmstadt
1962

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof.Dr. K.Egle

1. Gutachter: Prof.Dr. H.Janecke

2. Gutachter: Prof.Dr. C.Rohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.6.1962

Tag der Promotion: 30.7.1962

Inhaltsübersicht

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	5
1.1 Zusammensetzung des Wollfettes	5
1.2 Aufgabenstellung	6
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	8
2.1 Einteilung der Lipide	8
2.1.1 Einfache Lipide	8
2.1.2 Zusammengesetzte Lipide	9
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	25
3.1 Versuche zur Isolierung eines Phospholipoids aus Wollfett	26
3.2 Chromatographie der Phosphatide	41
3.3 Chromatographie des aus Wollfett isolierten Phosphatids	44
3.4 Untersuchung der Phosphatid- Spaltprodukte	50
3.5 Infrarotspektroskopie	73
3.6 Besondere Eigenschaften der Chloroform-Fraktion I	76
3.7 Diskussion	77
4 <u>Experimenteller Teil</u>	80
4.1 Gewinnung des Phospholipoids aus Wollfett	80
4.2 Phosphorbestimmungsmethoden	82
4.3 Chromatographie des Phospholipoids	89
4.4 Untersuchung der Phosphatid- Spaltprodukte	92
5 <u>Zusammenfassung</u>	100
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	101

1	<u>Einleitung</u>	5
1.1	Zusammensetzung des Wollfettes	5
1.2	Aufgabenstellung	6

1 Einleitung

1.1 Zusammensetzung des Wollfettes

Das Wollfett der Schafe besteht zum großen Teil aus Fettsäureestern von Zoosterinen und gesättigten aliphatischen Alkoholen, freien Sterinen, freien Fettsäuren, Lactonen und Kohlenwasserstoffen (1) und wird daher zu den Wachsen gruppiert.

Nach Untersuchungen von C h e v r e u i l (2) kommen im Wollfett keine Glyceride vor. Die durch Elementaranalyse festgestellten geringen N- und P-Anteile (3) lassen auf eine phosphatidähnliche Substanz schließen. S e n f t (4) konnte nachweisen, daß der Stickstoffgehalt weder von Schmutzresten der Wolle, noch von freien Aminosäuren des Wollschweißes herrührte. Außerdem gelang es ihm, den Stickstoff- und Phosphorgehalt einer Wollfettcharge durch Methanolextraktion zu erhöhen und nach Säurehydrolyse des Methanolextraktes folgende Bestandteile zu identifizieren:

Aminosäuren	Zucker und Zuckeralkohole
Asparaginsäure	Glukose
Glykokoll	Inosit
Glutaminsäure	Glycerin (Spuren)
Serin	
Alanin	
Cystin (oder Cystein)	
-Aminobuttersäure	
Ornithin	

Colamin und Cholin, Bestandteile der klassischen Phosphatide, konnten nicht gefunden werden. Die Untersuchungsbefunde von S e n f t führen zu dem Schluß, daß Inosit und die organischen Stickstoff- und Phosphorverbindungen einer Phospholipoidfraktion im Wollfett zugehören. Vermutlich handelt es sich um ein Lipoprotein, das als wesentliche Bestandteile Aminosäuren, Inosit, Zucker, Phosphorsäure und einen noch nicht identifizierten Lipidanteil enthält.

1.2 Aufgabenstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, mit Hilfe von Lösungsmitteln eine bisher nicht beschriebene phosphorhaltige Substanz im Wollfett der Schafe anzureichern, die zunehmende Anreicherung durch Phosphorbestimmungen zu kontrollieren und seine Spaltprodukte nach Partial- und Totalhydrolyse zu identifizieren.

	Seite
2	<u>Allgemeiner Teil</u> 8
2.1	Einteilung der Lipide 8
2.1.1	Einfache Lipide 8
2.1.1.1	Glyceride 8
2.1.1.2	Wachse 9
2.1.2	Zusammengesetzte oder komplexe Lipide 9
2.1.2.1	Phospholipide 9
2.1.2.1.1	Glycerinphosphatide 10
2.1.2.1.2	Derivate der Glycerin- phosphatide 13
2.1.2.1.3	Inositphosphatide (Phospho- inositide) 15
2.1.2.1.4	Sphingosinphosphatide 18
2.1.2.2	Glykolipide 20
2.1.2.2.1	Cerebroside 21
2.1.2.2.2	Ganglioside 22
2.1.2.3	Sulfolipide 24

2 Allgemeiner Teil

2.1 Einteilung der Lipide

Die folgende Einteilung der Lipide schien erforderlich, um die Gruppe der komplexen Lipide herauszustellen und deren Unterschiede auf Grund ihrer verschiedenen chemischen Zusammensetzung zu beschreiben.

Nach K a r l s o n (5) werden die eigentlichen Fette mit den fettähnlichen Stoffen, den Lipoiden, zur Gruppe der Lipide zusammengefaßt, weil sie die gleichen Löslichkeitseigenschaften besitzen. Sie sind fast ausnahmslos unlöslich in Wasser, dagegen löslich in organischen Lösungsmitteln, wie Benzol, Äther, Chloroform oder Chloroform-Methanol-Gemischen. Die Einteilung der Lipide auf Grund ihrer Löslichkeit, die auf B l o o r (6) zurückgeht, ist in mancher Hinsicht ungenau, da viele zur Gruppe der Lipide gehörende Stoffe nur in einer beschränkten Anzahl von Fettlösungsmitteln löslich sind. Sphingomyelin und die Cerebroside z.B. sind unlöslich in Äther und die Phosphatide unlöslich in Azeton (7). Wie die Gliederung der Lipide zeigt, handelt es sich um eine heterogene Stoffgruppe, deren einzelne Vertreter verschiedene physikalische Eigenschaften und sehr verschiedene chemische Zusammensetzung aufweisen. Für die Nomenklatur wurden in dieser Arbeit im wesentlichen die Vorschläge von F o l c h und S p e r r y (8) berücksichtigt, die sich nach chemischen Gesichtspunkten richten.

2.1.1 Einfache Lipide

2.1.1.1 Glyceride

In dieser Gruppe sind Fettsäuren und Glycerin überwiegend als Triglyceride verestert. Es ist zu unterscheiden zwischen einsäurigen, auch gleichsäurige oder einfache Triglyceride genannt, die nur eine Fettsäure enthalten und den mehrsäurigen Glyceriden. Letztere, in der Natur weit verbreitet, werden auch gemischte Glyceride genannt und enthalten zwei oder drei Fettsäuren (zweisäurige oder dreisäurige Glyceride). Neben Triglyceriden kommen bei nur teilweiser Veresterung des Glycerins auch Mono- und Diglyceride vor (9).

2.1.1.2 Wachse sind Ester von meist langkettigen Fettsäuren und höheren aliphatischen oder zyklischen Alkoholen. K a u f m a n n (9) erweitert unter dem Gesichtspunkt gleichartiger Anwendungen, vor allem auf Grund ähnlicher physikalischer Eigenschaften, den Wachsbegriff.

Bei der Einteilung einfacher Lipide berücksichtigt D e u e l (10) nur folgende Wachse:

echte Wachse, sowohl pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs stellen Ester dar, die sich aus Palmitinsäure-, Stearinsäure-, Ölsäure- und anderen höheren Fettsäureestern von Cetyl-, Octadecyl-, oder anderen höheren geradkettigen Alkoholen oder Sterin- und anderen zyklischen Alkoholen zusammensetzen.

2.1.2 Zusammengesetzte oder komplexe Lipide

H a n a h a n (11) versteht unter diesen Verbindungen Ester, die außer langkettigen Fettsäuren und einem Alkohol Phosphor, stickstoffhaltige Basen und Zucker enthalten können. Sie machen als Fettbegleitstoffe hauptsächlich den unverseifbaren Anteil der Fette aus und lassen sich auf Grund ihrer chemischen Konstitution wie folgt einteilen:

Phospholipide (Phosphatide)

Glycerinphosphatide

Derivate der Glycerinphosphatide

Inositphosphatide

Sphingosinphosphatide

Glykolipide

Cerebroside

Ganglioside

Sulfolipide (Sulfatide)

2.1.2.1 Phospholipide sind durch Phosphorsäure als Bestandteil ausgezeichnet. Der Name geht auf den deutschen Arzt T h u d i c h u m (1874 - 1901) zurück, der bei seinen Untersuchungen über Fettstoffe des Gehirns verschiedene phosphorhaltige Lipide isolierte (Kephalin, Sphingomyelin, Cerebroside) (12). Die physiologische Bedeutung der Phosphatide

machte sie in letzter Zeit zu einem der Hauptgegenstände biochemischer Forschung. Es besteht Klarheit darüber, daß die Phosphatide auf das engste an der Struktur bestimmter Zellkomponenten, sowie an Stoffwechselfunktionen, die mit dieser Struktur zusammenhängen, beteiligt sind (13). Außerdem können die Phosphatide in andere wichtige Zellfunktionen einbezogen werden, z.B. die Proteinsynthese. Sie treten als Komponenten der Zellmembran und des Zellkerns auf, sie spielen eine Rolle bei der Absorption sowie bei dem Abtransport des Gewebefettes, bei der Blutkoagulation, sie haben Bedeutung beim Ionentransport und sind beteiligt an der Permeabilität der Zellmembran. Zahlreiche Autoren befassen sich eingehend mit der Struktur und dem physiologischen Verhalten der Phospholipoide (7,10,11, 14-17).

Ihre Gliederung erfolgt nach den Alkoholkomponenten Glycerin, Inosit und Sphingosin in: Glycerinphosphatide, Inositphosphatide und Sphingosinphosphatide.

2.1.2.1.1 Glycerinphosphatide (Phosphoglyceride)

Es handelt sich um die Gruppe von Verbindungen, die als Bestandteil das Diacyl-glycerophosphoryl-Radikal (s. Abb. 1) besitzen (18): Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und die Phosphatidsäuren. Die von P a n g b o r n (19) für Cardiolipin gefundene Struktur würde ebenfalls in diese Gruppe passen.

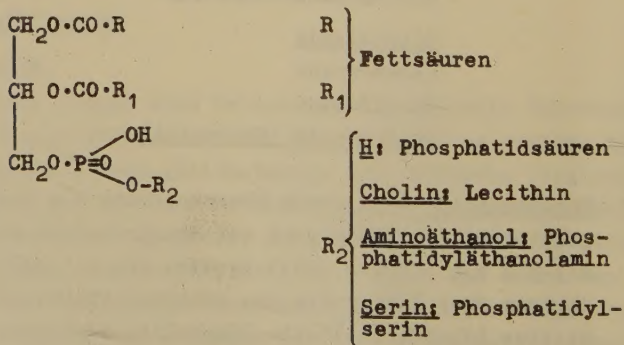


Abbildung 1

Phosphatidylcholin (Lecithin) oder auch Diacyl-glycerophosphorylcholin wurde erstmals in unreinem Zustand von G o b l e y (20) im Jahre 1846 aus dem Eigelb isoliert.

Vorkommen: in pflanzlichen und tierischen Geweben, wie Sojabohne, Erdnuß, Mais, Eigelb, Gehirn, Leber, Herzmuskel, Lunge und Niere.

Spaltprodukte: Glycerophosphorsäure, Cholin und Fettsäuren.

Chemischer Aufbau: Lecithin stellt ein Diglycerid dar, das durch den Phosphorsäurerest an Cholin gebunden ist. Isomere sind möglich, da Glycerophosphorsäure sowohl in der α - als auch in der β -Form auftreten kann, d.h. der Phosphorsäurerest kann sowohl in α - als auch in β -Stellung sein. Es hat sich erwiesen, daß Lecithin nur in der α -Form vorkommt (21). Man schreibt ihm nach neueren Untersuchungen eine Zwitterionenstruktur zu, die auf die Anwesenheit einer sauren und einer basischen Gruppe im Molekül zurückzuführen ist (7). Lecithin besteht meistens aus einem Gemisch verschiedener Präparate, die sich durch die Natur der Fettsäuren voneinander unterscheiden.

Besondere Eigenschaften: Die Substanz besitzt eine wachsartige Konsistenz, zeigt keinen definierten Schmelzpunkt, sie ist stark hygroskopisch und löst sich in Äther und Alkohol, nicht dagegen in Azeton.

Phosphatidyläthanolamin oder Diacyl-glycerophosphoryläthanolamin wurde schon sehr früh als Begleitsubstanz des Lecithins gefunden. Es ist ein Bestandteil der Kephalinfraktion, die zuerst aus Gehirn von T h u d i c h u m (1884) isoliert wurde (22).

Vorkommen: Gehirn, Leber, Eigelb, Muskel, Niere, Sojabohne.

Spaltprodukte: Glycerophosphorsäure, Aminoäthanol und Fettsäuren.

Chemischer Aufbau: Die Verbindung unterscheidet sich von Lecithin durch die N-Base (Aminoäthanol an Stelle von Cholin). Dieses Phospholipoid hat einen wesentlich höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren als dies bei Lecithin der Fall ist (11). Phosphatidyläthanolamin weist eine saure und eine basische Funktion auf. Man schreibt ihm Zwitterionenstruktur zu (7).

Besondere Eigenschaften: Es unterscheidet sich von Lecithin durch seine Schwerlöslichkeit in Alkohol.

Phosphatidylserin oder Diacyl-glycerophosphorylserin. F o l c h und S c h n e i d e r (23) fanden im "Rinderhirnkephalin" eine Verbindung, die mit Ninhydrin reagierte. F o l c h (24) konnte diesen Bestandteil als die Aminosäure Serin identifizieren. Er fand, daß Serin durch seine OH-Gruppe mit dem Diacyl-glycerophosphoryl-

Radikal verbunden ist.

Vorkommen: Als Bestandteil der Kephalinfraktion¹⁾ kommt es vor allem im Gehirn vor, es wurde jedoch auch in roten Blutkörperchen, Plasma, Eigelb und in der Kuhmilch gefunden.

Spaltprodukte: Glycerophosphorsäure, Fettsäuren und Serin. In dem von F o l c h (25) isolierten Produkt lagen vorwiegend Stearin- und Ölsäure vor.

Chemischer Aufbau: Es handelt sich, wie bei den ersten Vertretern der Gruppe um ein Esterphosphatid, das als Diacyl-glycerophosphorylserin bezeichnet werden kann.

Besondere Eigenschaften: Die Verbindung ist wie Phosphatidyläthanolamin schwer löslich in Alkohol und zeigt auf Grund von zwei sauren und einer basischen Komponente saure Reaktion.

Die Phosphatidsäuren (Diacyl-glycerophosphorsäuren)

Diese Gruppe von Phosphatiden, die dadurch ausgezeichnet ist, daß sie keinen Stickstoff enthält, wurde aus dem Protoplasma von Kohlblättern isoliert (26). Offenbar handelt es sich hier um Spaltprodukte der nativen stickstoffhaltigen Esterphosphatide, die durch fermentative Spaltung entstehen (27). Sie können deshalb als Abbau-produkte der bisher genannten Phosphatidgruppen (Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin) angesehen werden und stellen die einfachste Klasse der Phospholipoide dar.

Vorkommen: in Kohlblättern, Rizinusblättern, Rhabarber. Über ihr Vorkommen in tierischen Organismen wird nicht berichtet.

Spaltprodukte: Glycerophosphorsäure und Fettsäuren. Das anfallende Fettsäuregemisch ist in der Regel von sehr komplexer Natur (9).

Chemischer Aufbau: Die beiden Hydroxylgruppen der Glycerophosphorsäure sind mit Fettsäuren verestert. Man kann sich die Verbindung auch von einem Triglycerid abgeleitet denken, in welchem eine der Fettsäuren durch Phosphorsäure ersetzt ist.

Besondere Eigenschaften: löslich in Diäthyläther und 99%igem Alkohol. Das Na-Salz ist unlöslich in Äthanol-Diäthyläther (4:1), 99%igem Alkohol und Azeton, jedoch löslich in Diäthyläther. Die Löslichkeit der freien Säuren in Azeton ist im Gegensatz zu den übrigen Phosphatiden besonders hervorzuheben (11).

¹⁾ Zur Kephalinfraktion gehören die alkoholunlöslichen Phosphatide: Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Inosit enthaltende Phosphatide (14).

Cardiolipin. Die Verbindung ist offensichtlich nahe verwandt mit den aus Kohlblättern isolierten Phosphatidsäuren.

Vorkommen: P a n g b o r n isolierte dieses Phosphatid aus Rinderherz und gab ihm den Namen Cardiolipin (28).

Spaltprodukte: Nach alkalischer Hydrolyse konnten Ölsäure, Linolsäure, Glycerin und ein Polyester der Glycerophosphorsäure gefunden werden (28; 1947).

Chemischer Aufbau: Es wird angenommen, daß es sich um ein Derivat der Polyglycerinphosphorsäure handelt.

P a n g b o r n (28; 1947) schlägt eine Formel vor, die aus einer Kette von drei Phosphatidsäuren und einem Diglyceridradikal besteht. Verbunden sind diese Komponenten durch Phosphorsäurereste.

Besondere Eigenschaften: Wie die freien Phosphatidsäuren, so unterscheidet sich auch diese Substanz von allen anderen Phosphatiden durch die Löslichkeit in Azeton. Sie ist optisch aktiv und hatsaure Eigenschaften. Besonderes Interesse kommt der Verbindung deshalb zu, da sie zusammen mit Lecithin und Cholesterin eine spezifische Aktivität mit syphilitischem Serum besitzt (9).

2.1.2.1.2 Derivate der Glycerinphosphatide

Es sind Verbindungen, die nicht den Diacyl-glycerophosphorylanteil besitzen, die sich aber von den Glycerinphosphatiden ableiten lassen und oft mit ihnen vergesellschaftet vorkommen.

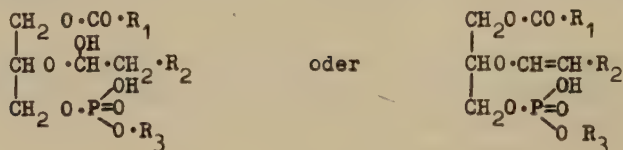
Die Plasmalogene (Acetalphosphatide). Diese Gruppe wurde von F e u l g e n und V o i t (51) entdeckt.

Vorkommen: in allen tierischen Geweben, vor allem im Nervengewebe und in der Muskulatur.

Spaltprodukte: Nach stark saurer Hydrolyse der Plasmalogene waren Glycerin, Phosphorsäure und Aldehyde nachzuweisen.

Chemischer Aufbau: Bis vor kurzem nahm man an, daß die Plasmalogene aus Glycerophosphorsäure, verestert mit einer N-Base, bestehen, an deren α - und β -C-Atom sich ein höherer Aldehyd in acetalartiger Bindung befindet. Neuere Untersuchungen (52) haben ergeben, daß die genuinen Acetalphosphatide außer einem Aldehyd noch einen Fettsäurerest im

Molekülverband besitzen. K l e n k und D e b u c h schlagen folgende Formeln vor.



R_1 = Fettsäurerest

R_2 = höherer Aldehydrest

R_3 = Cholin-, Colamin- oder Serinrest

Abbildung 2

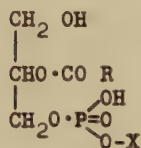
Besondere Eigenschaften: Die Plasmalogene ergeben eine positive F e u l g e n s c h e "Plasmal-Reaktion", die auf der bekannten Aldehydreaktion mit fuchsinschwefliger Säure beruht. Die Substanzen sind leicht löslich in Äther und verhalten sich nahezu wie Esterphosphatide, mit denen sie stets vergesellschaftet sind (9).

Die Lysophosphatide sind Derivate der Phosphatide und entstehen durch fermentative Abspaltung eines ihrer Fettsäurereste. Diese Spaltprodukte unterscheiden sich von ihren ursprünglichen Verbindungen durch Stabilitäts- sowie Löslichkeitseigenschaften und wirken hämolytisch. Die spezifischen Vertreter dieser Verbindungsklasse führen vor dem Namen des Phosphatids das Präfix "Lyso-". Die zu den "Lyso"formen führenden Enzyme wurden bisher allgemein als Lecithinasen bezeichnet. Besser erscheinen die vorgeschlagenen Bezeichnungen Phosphatidolipase, Phospholipase und Phosphatidase (14).

Vorkommen: in Pankreas und Speicheldrüsen von Pferden und Rindern, Eigelb, Gehirn von Meerschweinchen und Rindern, in alkoholischen Extrakten von poliertem Reis. Dies läßt auf die Anwesenheit von Phosphatidasen in den gleichen Organen schließen.

Chemischer Aufbau: Die bisher identifizierten Lysophosphatide sind Lysophosphatidyläthanolamin, Lysolecithin, Lysophosphatidylserin (14), Lysosphingomyelin (bei Einwirkung von Wespengift auf Sphingomyelin wird Lignocerylsäure abgespalten (53)) und Lysophosphatidyl-inosit (54). Sie sind durch Einwirkung von Schlangengift auf die entsprechenden Grundverbindungen herstellbar und unterscheiden sich

von diesen in ihrem chemischen Aufbau nur durch das Fehlen eines Fettsäurerestes. Den Lysophosphoglyceriden liegt folgende allgemeine Formel zu Grunde:



R = langkettige Fettsäure

X = $\begin{cases} \text{Cholin} \\ \text{Äthanolamin} \\ \text{Serin} \\ \text{Inosit} \end{cases}$

Abbildung 3

2.1.2.1.3 Inositphosphatide (Phosphoinositide)

Phospholipide, die Inosit als Bestandteil haben, werden als Inositphosphatide bezeichnet. Die Einteilung dieser Verbindungen richtet sich in erster Linie nach den bei der Hydrolyse gefundenen Spaltprodukten. Die Bezeichnung Monophosphoinositide trifft für alle Verbindungen zu, die Inosit-mono-phosphorsäure als Spaltprodukte aufweisen, während die Inosit-di-phosphorsäure enthaltenden Produkte als Diphosphoinositide bezeichnet werden. Eine dritte Gruppe bilden die komplexen Phosphoinositide (11).

Inosit wurde zuerst von A n d e r s o n (29) und Inosit-mono-phosphorsäure von C a s o n und A n d e r s o n (30) im wasserlöslichen Anteil des Hydrolysats der Tuberkelbazillenphosphatide gefunden. Der erste Beweis, daß Inosit in chemischer Bindung in einem Phosphatid vorliegt, wurde von F o l c h und W o o l l e y (31) und F o l c h (32) erbracht. Sie fanden Inosit in der Kephalinfraktion der Phosphatide des Gehirns und Rückenmarks. Inzwischen konnten Inositphosphatide aus mehreren tierischen und pflanzlichen Geweben isoliert werden, und es ist heute sicher, daß Inosit ein wesentlicher struktureller Bestandteil von Lipoiden ist.

Monophosphoinositide. Sie stellen den Verbindungstyp dar, der auch als Phosphatidylinosit bezeichnet werden kann und in enger Beziehung zu den Glycerinphosphatiden steht (s. Abb. 4).

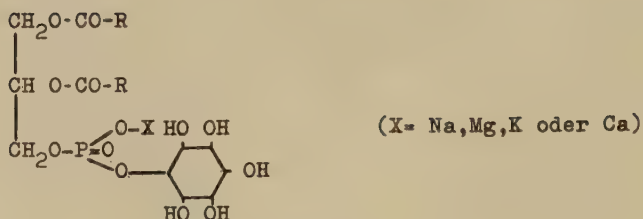


Abbildung 4

Da diese Inositide saure Substanzen sind, kommen sie meistens in Salzform vor (11).

Vorkommen: in Ratten-, Rinder- und Schweineleber, Herzmuskel, Hefe, Sojabohne, Weizenkeimen, wo sie annähernd 5 bis 10% der Gesamtphospholipoide ausmachen.

Spaltprodukte: Aus salzsauren Hydrolysaten (2n HCl, 98°, 5 Min.) der Phosphatidylinosite von Rinderleber, Rattenleber und Hefe konnten folgende Spaltprodukte isoliert werden (11):

Ätherlösliche Fraktion: freie Fettsäuren, Diglycerid, Monoglycerid, Phosphatidsäure.

wasserlösliche Fraktion: Inosit (frei), Inosit-mono-phosphorsäure, Glycerin (frei) und Glycerinphosphorsäure.

Chemischer Aufbau: Hydrolytische Untersuchungen führten zur Phosphatidylinositstruktur (Abb. 4). Es bleiben jedoch noch Fragen hinsichtlich der Bindung und der Lage bestimmter Gruppen innerhalb des Moleküls offen.

Besondere Eigenschaften: Als Bestandteil der Kephalinfraktion ist die Verbindung vollkommen unlöslich in Azeton und Äthanol (Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin zeigen geringe Löslichkeit in Äthanol), hingegen gut löslich in Chloroform.

Diphosphoinositide. Aus den Spaltprodukten der Säurehydrolyse des sauren Gehirn-Diphosphoinositids konnte F o l c h (33) ein Inosit-di-phosphat isolieren.

Vorkommen: im Gehirn und Lipositol der Sojabohne.

Chemischer Aufbau: H a w t h o r n e (34) schlug eine 12-gliedrige Ringstruktur vor (s. Abb. 5), während F o l c h und L e B a r o n (35) die Möglichkeit diskutierten, daß es sich um ein Polymeres der

Einheit Inosit-Diphosphat-Glycerin-Fettsäure handele.

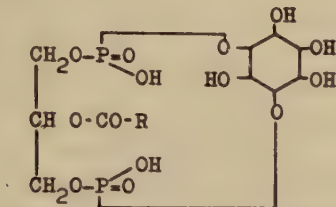


Abbildung 5

Wenn die Fettsäure mit Glycerin verestert ist, so kann es sich nach den Ergebnissen der Hydrolyse im Gegensatz zu Phosphatidylinosit (Diglycerid) nur um ein Monoglycerid handeln.

Besondere Eigenschaften: unlöslich in Azeton und Äthanol, wie Monophosphoinositid und löslich in Chloroform.

Komplexe Phosphoinositide

Die in der Natur vorkommenden Inositphosphatide haben sich nach bisherigen Untersuchungen zum großen Teil als Komplexe erwiesen. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf pflanzliches Gewebe (11).

Phytoglykolipide

Bei eingehenden Untersuchungen der Inositolipoide der Sojabohne entdeckten C a r t e r und Mitarbeiter eine langkettige Base (36), die sie als Phytosphingosin bezeichneten. Später fanden C a r t e r und Mitarbeiter (37) in Mais- und anderen Phospholipoiden von Pflanzensamen ein komplexes, Inosit-Phytosphingosin enthaltendes Lipid, das sie als Phytoglykolipid bezeichneten. Nach schwach alkalischer Hydrolyse, Gegenstromverteilung und chromatographischen Trennungungsverfahren konnte eine gereinigte Lipoidfraktion isoliert werden, die folgende Spaltprodukte enthielt: Phytosphingosin, Fettsäure, Phosphorsäure, Inosit, Glukosamin, Hexuronsäure, Galaktose, Arabinose und Mannose. C a r t e r und Mitarbeiter schlugen auf Grund hydrolytischer Untersuchungsmethoden folgende Teilstruktur des Komplexes vor (11):

dylserins das Verhältnis N:P=1:1 zukommt.

Vorkommen: Sphingomyeline sind bisher nur im Tierreich angetroffen worden und finden sich vor allem im Gehirn und Nervengewebe. Sie stellen einen wesentlichen Bestandteil der Myelinscheide der Nerven dar.

Spaltprodukte: L e v e n e (46) bestimmte als erster folgende Hydrolyseprodukte von Sphingomyelin: Phosphorsäure, Cholin, Sphingosin und Fettsäuren (besonders Lignocerinsäure).

Chemischer Aufbau: Da nach partieller Hydrolyse von Sphingomyelin Lignocerylsphingosin, Phosphorylcholin und Sphingosinphosphat isoliert werden konnten (11), muß Phosphorylcholin mit einer der beiden Hydroxylgruppen des Sphingosins verestert sein. L e v e n e (46; 1916) war es auch, der Lignocerylsphingosin als ein Fettsäureamid von Sphingosin erkannte.

Sphingosin, ein Δ^4 -1,3-Dihydroxy-2-amino-n-octadecen (s. Abb. 7), ist schon von T h u d i c h u m als Spaltprodukt der Sphingomyeline und Cerebroside aufgefunden worden. Die Substanz ist löslich in Äther und Alkohol und besitzt einen Schmelzpunkt von $82,5^\circ$. Zur näheren Charakterisierung eignet sich das gut kristallisierbare Triacetylsphingosin (9).

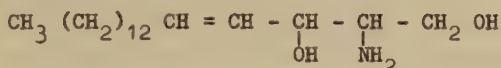
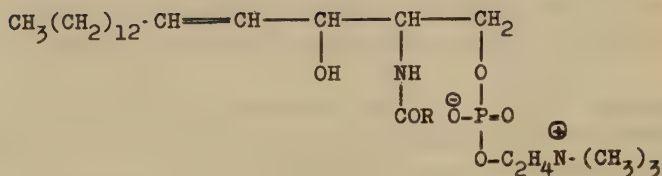


Abbildung 7 Sphingosin (7)

Außer Sphingosin konnte die gesättigte Base Dihydrosphingosin aus Sphingolipoiden tierischer Herkunft isoliert werden (C a r t e r und N o r r i s, 47, T h a n n h a u s e r und B o n c o d d o, 48). C a r t e r und Mitarbeiter (49) gelang die Isolierung der sphingosinähnlichen, langkettigen Base Phytosphingosin aus Maisphosphatiden. Das aus Sojabohnenlipiden gewonnene Dehydrophyto-sphingosin (50) scheint ein ungesättigtes Derivat von Phytosphingosin zu sein.

Sphingomyelin ist auf Grund hydrolytischer Ergebnisse wie folgt zu formulieren (Abb. 8).



R = Fettsäure

Abbildung 8 Sphingomyelin (14)

Die bisher beschriebenen Sphingomyelin-Präparate sind chemisch nicht einheitlich. Es handelt sich vielmehr um Gemische von verschiedenen Sphingomyelinen, die sich durch die Natur der Fettsäuren voneinander unterscheiden.

Besondere Eigenschaften: Sphingomyelin ist eine weiße, kristalline Verbindung, die beständig und nicht hygroskopisch ist. Sie ist gut löslich in heißem Methanol, Äthanol, Eisessig und Chloroform, etwas weniger löslich in Pyridin, unlöslich in Äther und kaltem Azeton. Sphingomyelin ist gegenüber Alkali wesentlich beständiger als die Glycerinphosphatide. Bei 37° werden Sphingosinphosphatide von n NaOH nicht angegriffen (11).

Es gibt Krankheiten, die durch die Anhäufung von Sphingolipiden gekennzeichnet sind: Sphingomyeline werden bei der N i e m a n n - P i c k ' s c h e n Krankheit ⁺⁾ gespeichert.

2.1.2.2 Glykolipide (zuckerhaltige Lipide)

Die große Gruppe der Glykolipide ist noch ungenügend untersucht. Der Name weist auf den Gehalt an Zucker hin. Zu den Glykolipiden gehören die Cerebroside und Ganglioside. Sie kommen mit den Phosphatiden vergesellschaftet vor, vor allem im Gehirn, enthalten aber keine Phosphorsäure (5).

⁺⁾ Die N i e m a n n - P i c k ' s c h e Krankheit ist eine tödlich verlaufende Störung des Lipoidstoffwechsels, deren Symptome Leber- und Milzvergrößerung, Anämie, leichte Leukozytose und häufig amaurotische Idiotie sind.

2.1.2.2.1 Die Cerebroside sind ihrem Aufbau nach mit den Sphingomyelinen verwandt. Sie unterscheiden sich dadurch, daß sie an Stelle des Phosphorylcholins in glykosidischer Bindung ein Molekül Zucker besitzen. Je nach Zuckeranteil wird zwischen Cerebro-galaktosiden und Cerebro-glukosiden unterschieden. Der Fettsäureanteil der Cerebroside ist, wie der der Sphingomyeline, relativ ungesättigt und unterscheidet sich (auch von dem der Glycerinphosphatide) durch seine Kettenlänge (nicht kürzer als C₂₂). Die Stickstoffbase ist entweder Sphingosin oder Dihydro-sphingosin.

Cerebro-galaktoside haben Galaktose als Zuckerkomponente. Vorkommen im Gehirn.

Spaltprodukte: Sphingosin, Galaktose und Fettsäuren. Bei der Spaltung von Gehirn-Cerebrosideen wurden folgende Fettsäuren isoliert: Cerebronsäure CH₃ (CH₂)₂₁ CHOH·COOH, Kerasinsäure (Lignocerinsäure) CH₃ (CH₂)₂₂ COOH, Nervon-säure CH₃·(CH₂)₇·CH=CH (CH₂)₁₃·COOH und 2-Oxy-nervonsäure CH₃·(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₁₂CHOH·COOH. In geringeren Mengen finden sich auch noch andere Säuren wie: Hexacosensäure, Stearinsäure und Palmitinsäure.

Chemischer Aufbau: Die einzelnen Cerebroside werden nach dem Fettsäurerest als Cerebron (Phrenosin), Kerasin, Nervon und Oxynervon bezeichnet. Die Fettsäuren liegen in Amidbindung vor, während das Zuckermolekül glykosidisch am C₁ des Sphingosins gebunden ist. Cerebroside können durch folgende Formel wiedergegeben werden (s. Abb. 9).

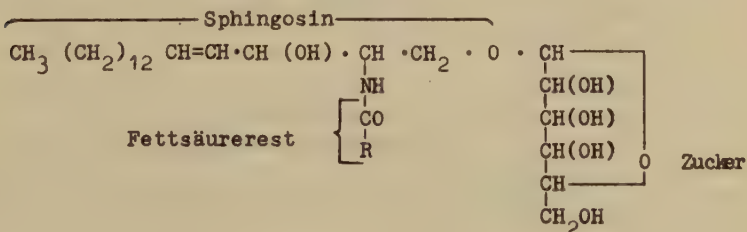


Abbildung 9 (7)

Besondere Eigenschaften

Es sind feste, reinweiße Substanzen, löslich in Pyridin und heißem Alkohol, schwerlöslich in Äther und Azeton.

Cerebro-glukoside

Sie unterscheiden sich von der vorhergehenden Gruppe durch den Zuckerrest Glukose.

Vorkommen:

Bei einer eigenartigen Störung des Lipoidstoffwechsels (Morbus Gaucher⁺) werden in Milz, Leber und anderen Organen glukosehaltige Cerebroside gespeichert, die in ihren Eigenschaften dem Kerasin sehr ähnlich sind.

Spaltprodukte: Sphingosin, Dihydrosphingosin, Glukose und Fettsäuren. Das Fettsäuregemisch zeigt folgende Zusammensetzung: C₁₆-C₂₀-Säuren (vorwiegend Palmitin- und Stearinsäure), C₂₂-Säure (n-Docosansäure) und C₂₄-Säure (n-Tetracosansäure).

Chemischer Aufbau:

Die chemische Zusammensetzung entspricht der allgemeinen Formel in Abb. 9, wobei der Zuckerrest Glukose ist.

2.1.2.2.2 Ganglioside

Der Name Ganglioside wurde von Klenk (55) einer cerebrosidähnlichen Substanz gegeben, die in Ganglienzellen des Nervensystems vorkommt. Die Ganglioside unterscheiden sich von den Cerebrosiden durch die zusätzliche Komponente Neuraminsäure. Die neuraminsäurehaltigen Bestandteile der Zellmembrane haben neuerdings besonderes Interesse gewonnen, weil sie bei der Fixierung der Virusteilchen eine Rolle spielen (5).

Vorkommen: in den Ganglienzellen des Nervengewebes, Erythrocyten, besonders im Gehirn der von der Tay-Sachs'schen Krankheit⁺⁺ befallenen Personen, in kleinen Mengen in der grauen Gehirns substanz von Gesunden und in der Milz.

⁺) Die Gaucher'sche Krankheit zeigt folgende Symptome: großer Milztumor und Lebervergrößerung, Leukopenie und Thrombopenie.

⁺⁺) Die Symptome der Tay-Sachs'schen Krankheit gleichen denen der amaurotischen Idiotie und der Niemann-Pick'schen Krankheit.

Spaltprodukte: Sphingosin oder sphingosinähnliche Basen, Hexosen (hauptsächlich Galaktose und wenig Glukose), Neuraminsäure oder deren Derivate (Sialinsäuren) und Fettsäuren. Die Fettsäuren unterscheiden sich je nach Herkunft des Gangliosids.

Ganglioside des menschlichen Gehirns: Stearinsäure
 Ganglioside der Rindermilz: Behen- und Lignocerinsäure
 Ganglioside in Pferdeerythrocyten: Lignocerin- und Nervonsäure

Chemischer Aufbau der Neuraminsäure

Neuraminsäure ist eine den Kohlenhydraten nahestehende Polyoxyamino-säure. Der Name geht auf B l i x zurück (56). Auch die Namen Sialinsäure (57-59), Gynaminsäure (60), Lactaminsäure (61-63) und Haemataminsäure (64, 65) sind in der Literatur gebräuchlich. Von B l i x , G o t t s c h a l k und K l e n k (66) kommt der Vorschlag, die unsubstituierte Verbindung mit Neuraminsäure und deren Acylderivate mit Sialinsäuren zu bezeichnen. Für N-Acetylneuramin-säure konnte folgende Formel ermittelt werden (67);

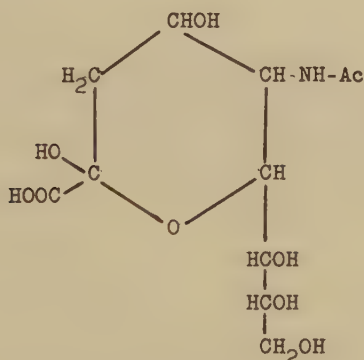


Abbildung 10

N-Acetylneuraminsäure

Theoretisch können sich Neuraminsäure und die Sialinsäuren mit Zuckern durch Glykosidbindungen und mit Aminosäuren durch Peptidbindungen vereinigen. Sie stellen so ein chemisches Bindeglied zwischen Polypeptiden und Polysacchariden dar. Die Struktur der Ganglioside ist noch nicht geklärt.

Besondere Eigenschaften: Durch den hohen Kohlenhydratgehalt sind die Ganglioside wasserlöslich. Die Sialinsäuren reagieren direkt mit E h r l i c h ' s p-Dimethylaminobenzaldehydreagenz (ohne vorherige Behandlung mit Alkali) und geben mit B i a l ' s - Reagenz eine rote Farbreaktion (68).

2.1.2.3 Sulfolipide (Sulfatide)

Vorkommen: Unter Sulfatiden sind nach T h u d i c h u m (12) schwefelhaltige Lipide zu verstehen, die aus Gehirn isoliert werden konnten. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich hierbei um Schwefelsäureester von Cerebrosiden handelt.

Spaltprodukte: Cerebronsäure, Sphingosin, Galaktose und Schwefelsäure.

N a k a y a m a (70) und T h a n n h a u s e r und Mitarb. (71) konnten zeigen, daß die Schwefelsäure mit der primären Hydroxylgruppe am C₆ der Galaktose verestert und daß die Galaktose am C₁ glykosidisch an das Cerebrosidmolekül gebunden ist.

3	<u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	
3.1	Versuche zur Isolierung eines Phospholipoids aus Wollfett	26
3.2	Chromatographie der Phosphatide	41
3.2.1	Papierchromatographische Methoden	41
3.2.2	Dünnschichtchromatographische Methoden	43
3.3	Chromatographie des aus Wollfett isolierten Phosphatids	44
3.3.1	Papierchromatographie	44
3.3.2	Dünnschichtchromatographie	48
3.3.3	Papierelektrophorese	49
3.4	Untersuchung der Phosphatid-Spaltprodukte	50
3.4.1	Hydrophile Phosphatid-Spaltprodukte	50
3.4.1.1	Phosphorsäure und deren Ester	50
3.4.1.2	Inosit	55
3.4.1.3	Zucker	57
3.4.1.4	Aminosäuren	60
3.4.1.5	Prüfung auf verschiedene hydrophile Substanzen im wasserlöslichen Anteil des Hydrolysats der Chloroform-Fraktion I (Glycerin, Kreatinin, Cholin, Neuraminsäure)	64
3.4.2	Lipophile Phosphatid-Spaltprodukte	65
3.4.2.1	Cholesterin	65
3.4.2.2	Sphingosin	71
3.4.2.3	Fettsäuren	73
3.5	Infrarotspektroskopie	73
3.6	Besondere Eigenschaften der Chloroform-Fraktion I	76
3.7	Diskussion	77

3.1 Versuche zur Isolierung eines Phospholipoids aus Wollfett

Die Isolierung von Phospholipoiden bereitet wegen ihrer Instabilität und der Ähnlichkeit der physikochemischen Eigenschaften besondere Schwierigkeiten. Die Abtrennung der Phosphatide von den verunreinigenden Begleitsubstanzen (Aminosäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Fettsäuren und anorganische Salze) geschieht vielfach auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit in differenten Lösungsmitteln. Da durch Assoziation der Lipode mit Begleitstoffen Löslichkeitsveränderungen hervorgerufen werden können, gibt es keine allgemeingültige Arbeitsmethode zur Isolierung und Reinigung von Phosphatiden.

Die am meisten angewandte Methode zur Entfernung von Fetten und Steroiden ist die Azetonfällung, jedoch bleiben dabei noch Verunreinigungen im Präzipitat; einige Phosphatide gehen bei diesem Verfahren, besonders in Gegenwart eines Überschusses an Fettsäuren, in beachtlicher Menge in Lösung.

Die wichtigsten in der Literatur aufgeführten Isolierungsmethoden werden, um einen Überblick zu vermitteln, zusammengestellt. Sie beziehen sich vor allem auf die Gewinnung eines Gesamtlipoidextraktes aus pflanzlichem und tierischem Gewebe, der dann durch Ausfällen, Säulenchromatographie oder Craigverteilung in die einzelnen Lipode aufgetrennt werden kann. Zum Teil werden auch aus Geweben bestimmte Lipoidfraktionen isoliert, unter Ausnutzung der unterschiedlichen Löslichkeit der einzelnen Gruppen.

Zusammenstellung verschiedener Methoden zur Isolierung von Phospholipoiden

Lösungsmittel	Fraktion	Methode	Literatur
Chloroform-Methanol (MeOH)	Gehirnlipide	Der Lipidanteil wird mit Wasser oder einer entsprechenden Salzlösung gewaschen (zur Entfernung aller nichtlipoiden Verunreinigungen).	72, 73
	Proteolipide aus dem Gehirn mit: 80-90% Protein 1,0-1,2% P 0,5-2,0% Kohlenhydrat	Durch Zentrifugieren einer wässrigen Emulsion der Gewebelipide wird eine Rohproteolipidfraction gewonnen, deren Auftrennung mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ gelingt. Die in der unteren Phase löslichen Stoffe werden mit Äther und dann mit Athanol extrahiert.	74
	Phosphatidopeptid aus Nebennierenrinde	Nach Behandeln des Gewebes mit Trichloressigsäure, Athanol, Äther und NaCl-Lösung konnte aus dem Rückstand mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}$ eine Phosphatidopeptidfraction isoliert werden.	75
	Phosphatidopeptide aus Gehirn	Verwendung eines sauren Lösungsmittelgemisches ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{n HCl}$) (200:100:1)	76
	Sphingomyelin aus Gehirn	Das Gewebe wird mit Azeton und Äther vorbehandelt und anschließend mit einem $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Gemisch extrahiert. Sphingomyelin ist aus dem Extrakt durch Ausfällen mit Azeton zu gewinnen.	77

Lösungsmittel	Fraktion	Methode	Literatur
Chloroform, anschließend Fällung mit Methanol	Monophosphatidyl- inosit aus Rinder- leber	Der ätherunlösliche Phosphatidan- teil wird durch Fällung aus einer Chloroform-Lösung mit Methanol in die einzelnen Fraktionen-Monophos- phatidylinosit und Diphosphatidyl- inosit getrennt.	78
	Inositphosphatide aus Gehirn und Erdnußöl	Das Rohphosphatid wird in Chloro- form gelöst und zur Reinigung mit Methanol gefällt.	79 80
Chloroform, anschließend Fällung mit Äthanol	Auftrennung der Ke- phalinfraktion des Rinderhirns	Die ätherlöslichen, alkoholunlös- lichen Phosphatide werden in Chloroform gelöst, und mit abso- lutem Alkohol werden fünf ver- schiedene Anteile ausgefällt.	81 82
Methanol	Phosphatide aus Eigelb und Ei- pulver	Extraktion mit kaltem Methanol	83
	Blutphosphatide	Extraktion der Blutphosphatide mit Methanol	84

Lösungsmittel	Fraktion	Methode	Literatur
Methanol	Phosphatide aus pflanzlichem Gewebe	Extraktion mit siedendem Methanol, Verdünnung der Lösung und Adsorption der Phosphatide an Bleisulfid.	85
	Lecithin und ähnliche Verbindungen	Verunreinigungen werden durch Extraktion mit Azeton entfernt. Der Rückstand wird dann mit Methanol behandelt, um Protein-komplexe aufzuspalten und die Phosphatide zu lösen.	86
	Phosphatidfraktion aus Wollfett	Durch Extraktion mit heißem Methanol konnte eine Phosphatidfraktion aus Wollfett der Schafe angereichert werden.	4
Äthanol	Phosphatide	Extraktion der Phosphatide aus Eigelb mit kaltem Äthanol	83
	Lecithin aus Eigelb	Nach Suspension in Azeton, Extraktion des Rückstandes mit Äthanol, anschließend Fällung des Ätherlöslichen Anteils mit CdCl_2 -Lösung	87
	Lecithin aus Eigelb, Leber und Gehirn	Nach Extraktion des Eigelbs mit heißem Äthanol Fällung mit methanolischer CdCl_2 -Lösung	88
	Acetalphosphatide aus Rindfleisch	Nach Äthanolextraktion, Auftrennen mit Azeton und Äther	89

Lösungsmittel	Fraktion	Methode	Literatur
Äthanol	Sojabohnenphosphatide	Extraktion der Phosphatide mit heißem Äthanol	90
	Phosphorhaltiges Lipoid aus Hunde- bzw. Pferdemuskeln	Extraktion mit absolutem Alkohol	91
	Blut- und Gewebephosphatide	Isolierung der Phosphatide mit heißem Äthanol, Reinigung mit Azeton und einer alkoholischen $MgCl_2$ -Lösung	92
Äthanol-Äther	Blutphosphatide	Isolierung der Phosphatide mit Äthanol/Äther (3:1)	93
	Phosphatide aus Rattenleber	Lösungsmittelgemisch: Äthanol/Äther (3:1)	94
	Blutphosphatide	Isolierung in der Kälte mit Äthanol/Äther	95
	Phosphatide aus <i>Cysticercus fasciolaris</i> (Bandwurmlarve)	Stufenweise Extraktion mit Azeton Äthanol/Äther Chloroform	96
Äthanol-Benzol	Sojabohnenphosphatide	Lösungsmittelgemisch: 20% Äthanol-80% Benzol	97
	Phosphatide aus Ei und Eipulver	Lösungsmittelgemisch: Äthanol-Benzol (1:1)	98
	Lecithin aus pflanzlichem Material (Sojabohnen, Baumwollsaamen, Erdnüsse)	Extraktion der Rohphosphatide mit Äthanol-Benzol	99

Lösungsmittel	Fraktion	Methode	Literatur
Äthanol-Benzol-Petroläther	Sojabohnenphosphatide	Isolierung der Phosphatide mit Äthanol-Benzol-Petroläther (1:1:1)	97
Azeton, Petroläther, Äthanol-Benzol	Phosphatide aus pflanzlichem Gewebe	Stufenweise Extraktion mit Azeton, Petroläther und Äthanol-Benzol (1:4)	100
a) Azeotropisches Gemisch von aliphatischen Kohlenwasserstoffen und Alkoholen (Äthanol oder Methanol) b) Azeotropisches Gemisch von aromatischen Kohlenwasserstoffen und Alkoholen (Äthanol oder Methanol)	Lecithin aus Sojabohnenöl	Die Phosphatide werden mit einem azeotropischen Gemisch extrahiert. Nach dem Abkühlen der Lösung erfolgt die Ausbildung von zwei Schichten; Das Öl befindet sich in der oberen Kohlenwasserstoffphase, während die untere, alkoholische Phase Lecithin, Kohlenhydrate und andere Begleitstoffe enthält.	101
Äther	Sojabohnenphosphatide	Reinigung der Phosphatide durch Lösen in Äther und Abtrennen des ätherunlöslichen Anteils	102
Azeton, Äther	Hirnhirnkaphalin	Stufenweise Extraktion des Hirnhirns mit Azeton (Cholesterin, Neutralfette) und Äther (Kephalinfraktion)	54, 103, 104

Angewandte Methoden zur Anreicherung eines Phospholipoids in Wollfett

Einige der bisher erwähnten Isolierungsverfahren wurden angewandt, und die Anreicherung eines phosphorhaltigen Lipoids in Wollfett durch vergleichende Phosphorbestimmungen (Halbmikromethode nach B e c k e r und K r u l l , 105) verfolgt.

Methanolextraktion

Nach Extraktion verschiedener Wollfettchargen (Wollfett A, Wollwachsalkohole und flüssiges Lanolin) mit siedendem Methanol (S e n f t , 4) war in den einzelnen methanollöslichen Fraktionen nur eine geringfügige Erhöhung des Phosphorgehaltes festzustellen.

Tabelle 2

Anreicherung des Phosphorgehaltes in verschiedenen
Wollfettchargen nach Methanolextraktion

Fraktion	mg % P_2O_5	Anreicherung
Wollfett A	0,27	etwa 1:5
Methanolextrakt von Wollfett A	1,25	
Wollwachsalkohole	0,42	0
Methanolextrakt der Wollwachsalk.	0,40	
Flüssiges Lanolin	0,25	etwa 1:3
Methanolextrakt von flüssigem Lanolin	0,72	

Azeton-Äther-Extraktion

Wollfett B wurde nach der Methode von F o l c h (103) mehrmals mit kaltem Azeton extrahiert, der azetonunlösliche Anteil aus einer Chloroformlösung mit Azeton gefällt und anschließend mit absolutem Alkohol umgefällt und das Präzipitat mit Hilfe der Gefrier-trocknung vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Auftrennung der in Azeton und absolutem Alkohol unlöslichen, aber ätherlöslichen Fraktion (nach F o l c h wird sie als Kephalinfraktion bezeichnet) erfolgte nach der Chloroform-Äthanol-Methode (F o l c h , 81, H ö r h a m m e r und H ö l z l , 54). Diese führte nach mehrmaligem Fällen mit absolutem Alkohol zu fünf verschiedenen Anteilen (F o l c h - Fraktionen).

Die F o l c h - Fraktion I zeigte gegenüber der Ausgangssubstanz (Wollfett B) einen um das 13-fache erhöhten Phosphorwert. Die Fraktionen II - V enthielten keinen Phosphor. Ein Schema soll die Anreicherung des Phosphorgehaltes nach den einzelnen Fraktionierungsverfahren veranschaulichen.

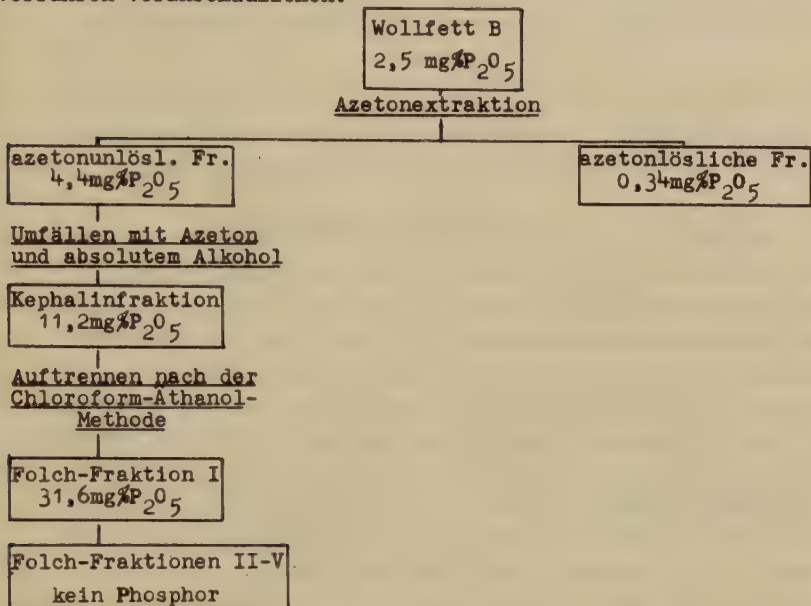


Abbildung 11

Versuch zur Reinigung der F o l c h - Fraktion I mit Hilfe der
Gegenstromverteilung

Nach der Methode des Kreislaufverfahrens (H e c k e r , 106) wurden 75 Verteilungsschritte durchgeführt (Verteilungsmittel: Azeton/Äthanol/Wasser (20:10:3)/Petroläther (Kp. 50-70°C). Der azetonunlösliche Rückstand der vereinigten Oberphasen, sowie der azetonunlösliche Rückstand der gesammelten Unterphasen wurde zur Entfernung des Lösungsmittels der Gefriertrocknung unterzogen. Der Phosphorgehalt des Unterphasenrückstandes war um das 20-fache höher als der des Wollfettes B (Ausgangssubstanz), während der Oberphasenrückstand nur eine 8-fache Phosphoranreicherung (gegenüber der Ausgangssubstanz) aufwies.

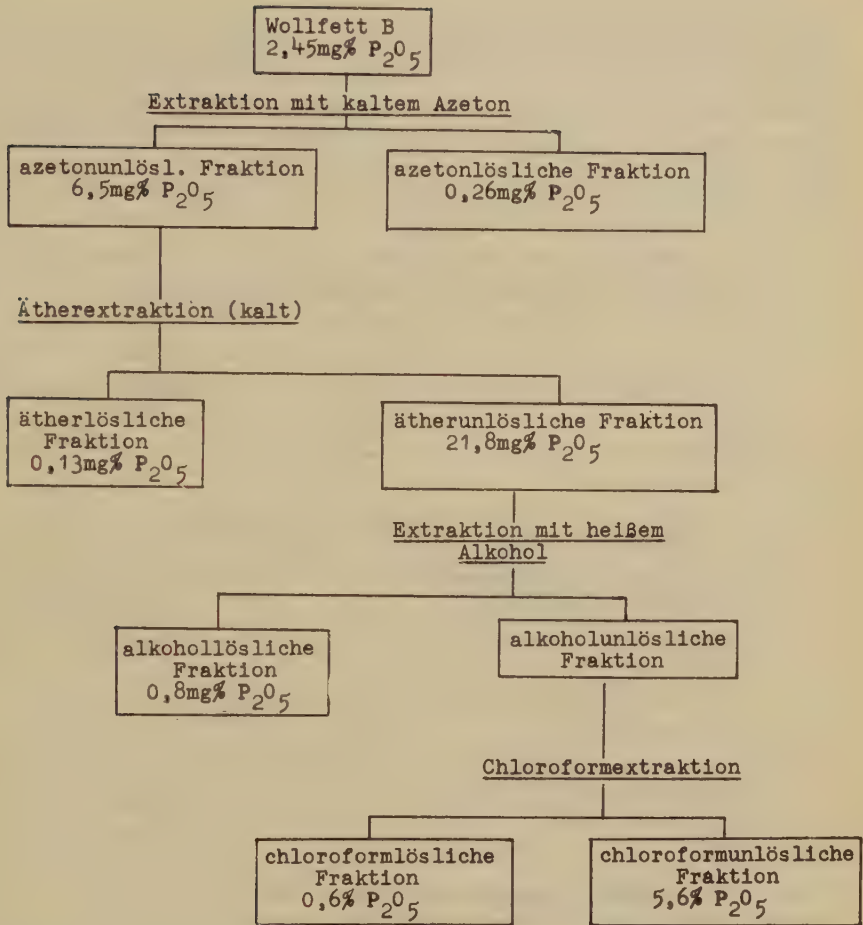
Phosphorgehalte in den nach Gegenstromverteilung erhaltenen
Fraktionen

Azetonunlöslicher Anteil der Gesamtoberphasen	20mg% P_2O_5
Azetonunlöslicher Anteil der Gesamtunterphasen	53mg% P_2O_5

Da nach Säurehydrolyse dieser angereicherten, phosphorhaltigen Substanzen noch keine Spaltprodukte identifiziert werden konnten, mußte eine geeignetere Isolierungsmethode gefunden werden.

Azeton-Äther-Äthanol-Chloroform-Extraktion

Die Extraktion des Wollfettes B mit kaltem Azeton führte zu einer Anreicherung des Phosphorgehaltes auf das Dreifache. Die Auftrennung des azetonunlöslichen Anteils erfolgte durch Extraktion mit kaltem Äther. Die ätherunlösliche, phosphorhaltige Fraktion hatte einen achtfach höheren Phosphorwert als die Ausgangssubstanz. Es gelang, Verunreinigungen, wie Sterine und deren Ester zum größten Teil mit heißem Äthanol zu entfernen. Diese Methode hat den Nachteil, daß dabei komplexe Lipide, wie zum Beispiel Lipoproteide, gespalten werden können. Der alkoholunlösliche Rückstand war nicht vollkommen in Chloroform löslich. Die beiden Fraktionen, die chloroformlösliche und die chloroformunlösliche, hatten einen hohen Phosphorgehalt (s. Extraktionsschema, Abb. 12). Der Gang der Reinigung soll durch das folgende Schema gezeigt werden.



Anreicherung einer phosphorhaltigen Fraktion aus Wollfett B
nach der Azeton-Äther-Äthanol-Chloroform-Methode

Abbildung 12

Nachdem sich die Azeton-Äther-Methode zur Anreicherung eines Phospholipoids als geeignet erwiesen hatte, erschien es notwendig, für weitere Isolierungsversuche eine Ausgangssubstanz mit möglichst hohem Phosphorgehalt zu finden. Verschiedene Wollfettchargen und Wollwachsalkohole wurden auf ihren Phosphorgehalt nach der Methode von B e c k e r und K r u l l (105) untersucht. Die Ergebnisse sind in einer Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3
Zusammenstellung der Phosphorwerte verschiedener
Wollfettssorten +)

Sorte	mg% P_2O_5	mg% P
Wollfett A	0,27	0,12
Wollwachsalkohole A	0,42	0,18
Flüssiges Lanolin B	0,25	0,10
Wollfett B	2,45	1,06
Rohwollfett B	14,58	6,36
Rohwollfett C	2,94	1,28

Bei weiteren Extraktionsversuchen fand das Rohwollfett B, als die Probe mit dem größten Phosphorgehalt, Verwendung.

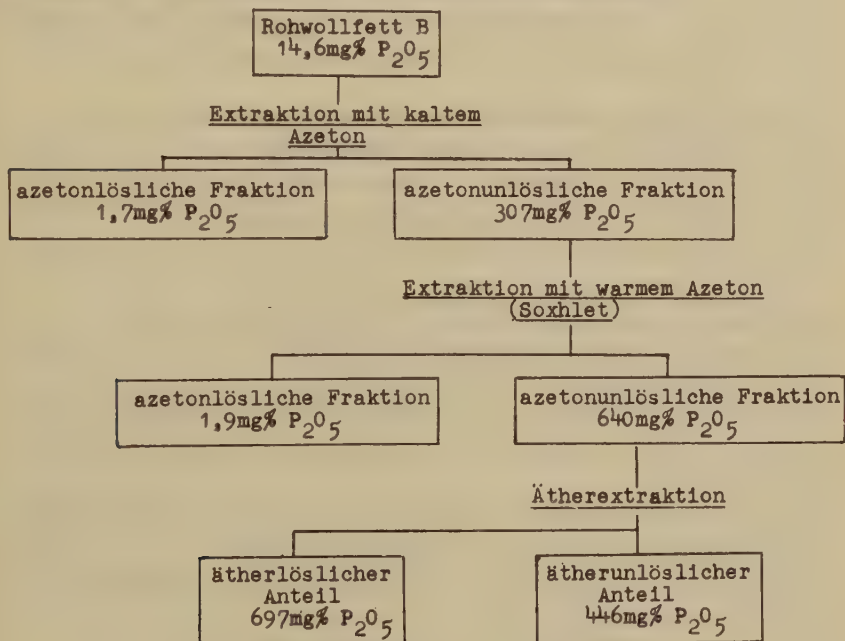
Azeton-Äther-Extraktion des Rohwollfettes B und säulenchromatographische Reinigung des Phospholipoids

a) Extraktion

Das Rohwollfett B wurde zunächst mit kaltem und anschließend in einer Soxhletapparatur mit warmem Azeton extrahiert. Im azetonlöslichen Anteil entstand nach dem Abkühlen ein weißer Nieder-

+) Wir danken auch an dieser Stelle den Firmen Wollwäscherei und -kämmerei in Döhren (Hannover) und der Westbrook Lanolin Company (Bradford) für die bereitwillige Überlassung verschiedener Proben.

schlag, der im wesentlichen aus Sterinen bestand. Nach dem Behandeln des azetonunlöslichen Rückstandes mit Äther (kalt), verblieb ein ätherunlöslicher Rückstand, der nach mehrmaligem Reinigen mit kaltem Äther durch Zentrifugieren von der ätherlöslichen Fraktion abgetrennt wurde. Da es sich bei dem ätherunlöslichen Rückstand um eine Sphingolipoidfraktion handeln konnte, wurde dieser mit heißem Äthanol extrahiert. Der Äthanolanteil enthielt nach dem Eindampfen keinen Rückstand, so daß Sphingolipoide (Cerebroside, Cerebroside-sulfate, Sphingomyelin und Ganglioside) bei der Untersuchung der ätherunlöslichen Fraktion auszuschalten waren. Der Gang der Isolierung gibt das folgende Schema wieder.



Anreicherung eines Phospholipoids aus Wollfett B nach der
Azeton-Äther-Methode

Abbildung 13

b) Säulenchromatographische Reinigung des aus Rohwollfett B isolierten Phospholipoids

Die chromatographische Reinigung und Trennung von Phospholipoiden auf Kieselgelsäulen ist eine bewährte, in der Literatur mehrfach beschriebene Methode (107-112). Als Elutionsmittel finden Azeton, Diäthyläther, Methanol oder Chloroform-Methanol-Gemische Verwendung.

Durch stufenweises Eluieren der ätherlöslichen Lipoidfraktion (697 mg% P_{2O_5}) mit Azeton, Chloroform und Methanol von Kieselgelsäulen (die Gewinnung der ätherlöslichen Lipoidfraktion wird in Abb. 13 gezeigt), war eine Reinigung von Sterinen und Auftrennung des Phosphatids zu erzielen. Die einzelnen Eluate wurden chromatographisch auf ihre Reinheit geprüft (s. Chromatographie des Phospholipoids auf Seite 44).

Das Azeton-Eluat enthielt die im ätherlöslichen Phosphatidanteil vorhandenen Sterine gelöst. Sowohl die Liebermann-Burchard-Reaktion (114), als auch die papierchromatographische Probe mit Phosphorwolframsäure verliefen positiv, während mit Ammoniummolybdat-Reagenz keine positive Reaktion eintrat.

Das Chloroform-Eluat enthielt nach dünnschichtchromatographischer und papierchromatographischer Untersuchung keine freien Sterine mehr und erwies sich als einheitlich.

Mit Methanol ließ sich eine weiße Substanz herauslösen, die, ebenso wie das chloroformlösliche Lipoid, Phosphor und Stickstoff enthielt.

Insgesamt konnten aus Rohwollfett B durch Extraktion mit Azeton und Äther und säulenchromatographische Reinigung (auf Kieselgelsäulen) mit Azeton, Chloroform und Methanol drei phosphorhaltige Substanzen isoliert werden:

1. Chloroform-Fraktion I
2. Methanol-Fraktion
3. Ätherunlösliche Fraktion

Stickstoff- (Kjeldahl, 115) und Phosphorbestimmungen (nach Beveridge und Johnson, 113) führten zu folgendem Ergebnis:

Tabelle 4

Stickstoff- und Phosphorwerte der drei aus Rohwollfett
isolierten Fraktionen

Fraktion	%N	%P ₂ O ₅	%P
Chloroform-Fraktion I	0,57	5,68	2,48
Methanol-Fraktion	0,5	1,25	0,54
Ätherunlösliche Fraktion	2,76	2,63	1,14

Die beschriebenen drei Fraktionen (Seite 38) sind im folgenden Teil Gegenstand analytischer Untersuchungen. Es soll noch hervorgehoben werden, daß eine etwas abgewandelte Azeton-Äther-Extraktionsmethode (S. 37) zu einer Chloroform-Fraktion II führte (nach Reinigung über einer Kieselgelsäule), die einen noch höheren Phosphorgehalt hatte als die bereits erwähnte Chloroform-Fraktion I (s. Tabelle 5).

Bei dieser Methode konnte nach schonender Azetonextraktion des Rohwollfettes B ein Rückstand gewonnen werden, der den Hauptanteil des Phospholipids und als Verunreinigung Sterine enthielt. Durch Verreiben des Rückstandes mit Kieselgel wurde eine weitere Extraktion mit Azeton in einer Soxhletapparatur erleichtert. Bei Behandeln des nun verbliebenen a z e t o n u n l ö s l i c h e n Anteils mit kaltem Äther verblieb kein ä t h e r u n l ö s l i c h e r Rückstand. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die beschriebene ä t h e r u n l ö s l i c h e Fraktion während des Isolierungsprozesses durch Abspaltung entstanden ist und somit das Spaltprodukt eines Phospholipoidkomplexes darstellt. Bemerkenswert ist der niedrige Stickstoffgehalt der Chloroform-Fraktion II.

Tabelle 5

Fraktion	%N	%P ₂ O ₅	%P
Chloroform-Fraktion II	0,2	10,42	4,54

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenstellung der Stickstoff- und Phosphorwerte der Chloroform-Fraktion II.

3.2 Chromatographie der Phosphatide

3.2.1 Papierchromatographische Methoden

Während die pc Analyse hydrophiler Substanzen im allgemeinen ohne größere Komplikationen durchgeführt werden kann, bereitet sie bei der Untersuchung lipophiler Stoffe noch einige Schwierigkeiten. Zur PC von Phosphatiden und anderen komplexen Lipoiden wurden unbehandelte und mit Kieselsäure (oder anderen Imprägnierungsmitteln) vorbehandelte Papiere verwendet. Bei diesen Papieren ist der Imprägnierungsgrad von großer Wichtigkeit, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Da dieser jedoch nicht immer gleichartig eingestellt werden kann, zeigt sich hier eine Schwierigkeit für Reihenuntersuchungen.

Versuche mit unbehandelten Papieren ergaben, daß die Trennwirkung der verwendeten Entwicklersysteme nicht ausreichte. In Tabellen werden die wichtigsten, in der Literatur bisher beschriebene Methoden zur pc Trennung von Phosphatiden zusammengefaßt.

Tabelle 6

Chromatographie von Phosphatiden auf unbehandelten Papieren

Entwicklersystem	Literatur
Chloroform/Äthanol/Wasser (800:200:25)	116
Phenol als mobile Phase	117
Gemische von Ketonen und Eisessig: 2-Pentanon/Eisessig (30:2) 3-Methyl-2-butanon/Eisessig (30:3) 4-Methyl-2-pentanon/Eisessig (30:2) 2,6-Dimethyl-4-heptanon/Eisessig (30:7)	118

Entwicklersystem	Literatur
Lutidin/Methanol (3:2)	119
Zuerst mit Azeton/Methanol (1:1) und anschließend mit wassergesättigtem Phenol in der gleichen Richtung entwickeln.	117
<u>Zweiphasenchromatographie</u>	
a) nicht polares Lösungsmittel (aufsteigend)	120
b) polares Lösungsmittel (absteigend)	
Diisobutylketon/Methylisobutylketon/Methyläthylketon/Chloroform/Ameisensäure/Wasser (30:26:20:110:30:3) Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6) Diisobutylketon/Ameisensäure/Wasser (40:15:2) Diisobutylketon/Methylisobutylketon/Ameisensäure/Methyläthylketon/Glycerin (30:20:10:25:3) Tetrahydrofuran/Äther/Wasser (60:15:10)	121
glyceringesättigtes Azeton	
	122

Tabelle 7

Chromatographie von Phosphatiden auf vorbehandelten Papieren

Imprägnierungsmittel	Entwicklersystem	Literatur
Kieselsäure	Methanol/Chloroform (1:4)	123
Kieselsäure	Lösungsmittelgemisch aus Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser	124
Glasfaserpapier, imprägniert mit Kieselsäure	15, 25, 50, 70 und 90% (V/V) Methanol in Äthyläther	125
Glasfaserpapier, imprägniert mit Kieselsäure	Phenol/Äthyläther/Azeton/Wasser (20:40:25:5)	126

Imprägnierungsmittel	Entwicklersystem	Literatur
Formalin	Oberphase von n-Butanol/Eisessig/ Wasser (4:1:5)	127

3.2.2 Dünnschichtchromatographische Methoden

Das von K i r c h n e r, M i l l e r und K e l l e r (128) beschriebene, von S t a h l (129) weiterentwickelte Verfahren, hat gegenüber der Säulenchromatographie den Vorzug, daß die Flecke mit Sprühreagenzien sichtbar gemacht werden können. Das Adsorbens (Kieselgel G) wird in dünner Schicht auf Glasplatten gestrichen und getrocknet. Im Gegensatz zur Papierchromatographie ist die Laufzeit kurz, und man kann mit aggressiven Reagenzien arbeiten.

Auf dem Lipoidgebiet wurde die Dünnschichtchromatographie bisher wenig verwendet. Sie ist gut geeignet für Routineuntersuchungen und Tests während eines Isolierungsganges und bietet die Möglichkeit zur präparativen Reinigung von Lipoiden. Die zur dünn-schichtchromatographischen Bestimmung von Lipoiden beschriebenen Methoden sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Dünnschichtchromatographie von Lipoiden
(Trennschicht: Kieselgel G (Merck))

Fraktion	Entwicklersystem	Literatur
Cholesterin, dessen Ester, Lecithin und Fettsäuren	zuerst Propanol/Ammoniak (2:1) dann Chloroform/Benzol (3:2) nach Drehen um 180° Tetrachlorkohlenstoff	130
Cerebron, Kerasin, deren Schwefelsäureester, Sphingolipoide	n-Propanol/12,5% Ammoniak	131
Sphingolipoide	Chloroform/Methanol/Wasser (60:35:8)	132
Esterphosphatidgemische	Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)	

Fraktion	Entwicklersystem	Literatur
Steroide	Chloroform und isoelutrope Gemische	153
	Cyclohexan/Essigester (70:30)	134
	Chloroform/Azeton (9:1)	135

3.3 Chromatographie des aus Wollfett isolierten Phosphatids

3.3.1 Papierchromatographie

Es sollte eine geeignete Methode zur PC der lipophilen, phosphorhaltigen Fraktion (Chloroform-Fraktion D) gefunden werden, um diese auf Einheitlichkeit prüfen zu können. Die Sichtbarmachung des Phospholipoids erfolgte mit Ammoniummolybdat-Reagenz (136).

Versuche mit paraffinimprägnierten Papieren führten nach der aufsteigenden Methode mit verschiedenen Fließmitteln zu keinem guten Erfolg. Ebensowenig konnte die Chloroform-Fraktion I auf Kieselsäurepapieren mit Chloroform/Methanol (5:1) und Chloroform/Methanol (3:1) + 2% Wasser entwickelt werden.

Bei der Methode von H ö r h a m m e r ⁺⁾ und Mitarbeitern (127) mit Formalinpapier und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) als Fließmittel verblieb, wie bei den schon aufgeführten chromatographischen Versuchen, nach dem Behandeln mit Ammoniummolybdat-Reagenz ein blauer Fleck am Startpunkt.

Brauchbare Ergebnisse wurden mit unbehandeltem Papier und dem Entwicklersystem Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6) erzielt (121).

⁺⁾ Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre, München, danken wir herzlich, daß er uns Formalinpapier-Proben zur Verfügung stellte.

Nach der aufsteigenden Methode gelang mit dem relativ schnell wandernden Fließmittel (4 Std. Entwicklungszeit bei einer Laufstrecke von 20 cm) eine Trennung der Phospholipoidfraktion von verunreinigendem Sterinanteil (s. Abb. 14).

Fließmittelfront



Abbildung 14

Chromatographische Auftrennung
des ungereinigten Phosphatids
(Zeichnung)

Anfärbemittel:

Streifen 1: Rhodamin-B

Fleck B : Phospholipoid

Fleck C : Sterin

Streifen 2: AgNO_3 -Reagenz

Fleck A : reduzierende
Substanz in der
Rohphosphatid-
fraktion

Das gleiche Verfahren erwies sich zur Reinheitsprüfung der einzelnen nach säulenchromatographischer Auftrennung des Rohphosphatids entstandenen Fraktionen als geeignet (s. Abb. 15).

Die Chloroform-Fraktion I stellt nach papierchromatographischer Untersuchung eine einheitliche Substanz dar.

Die Methanol-Fraktion hinterließ einen am Startpunkt mit Silbernitrat- und Ammoniummolybdatlösung reagierenden Fleck, der mit Rhodamin-B-Lösung nicht anfärbbar war. Das Kenntlichmachen der einzelnen Flecke erfolgte durch die in Tabelle 9 zusammengestellten Farbreaktionen.

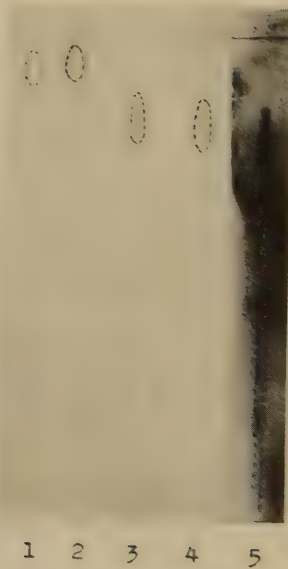


Abbildung 15

Rf 0,94 PC der Azeton- und
Rf 0,81 Chloroform-Fraktion +)

Anfärbemittel:

Azeton-Fraktion:

Streifen 1: Rhodamin-B

Streifen 2: Phosphorwolframsäure

Chloroform-Fraktion:

Streifen 3: Rhodamin-B

Streifen 4: Phosphorwolframsäure

Streifen 5: Ammoniummolybdat

Tabelle 9

Farbreaktionen verschiedener Lipide

Reagenz	anfärbbare Substanzen	Farbe	Lit.
Rhodamin-B	Phosphatide, Cerebroside	rosa	121
	Cholesterin	weißrosa	
Ammoniummolybdat-Perchlorsäure	Phosphatide	blau	130
Dipikrylamin	Sphingomyelin, Lecithin, höhere Fettsäuren und Neutralfette	gelb	121
Phosphorwolframsäure	Sterine	rotviolett	110

+) Die Flecke wurden bei einem Teil der abgebildeten Chromatogramme zur besseren Sichtbarmachung etwas verstärkt.

Reagenz	anfärbbare Substanzen	Farbe	Lit.
Antimon-3-chlorid	Steroide	violett	119
Silbernitrat	Zucker und Inosit	braun-schwarz	4
Ninhydrin	NH ₂ -haltige Lipide	violett	136

Die angegebenen Färbemethoden führten bei einem Chromatogramm der Chloroform-Fraktion I zu folgendem Ergebnis (s. Abb. 16):

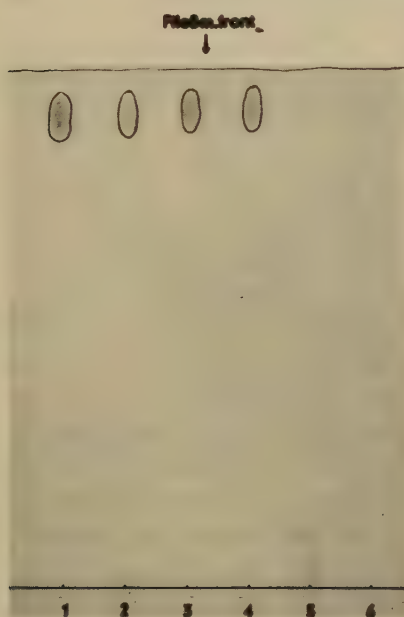


Abbildung 16

PC der Chloroform-Fraktion I
(Zeichnung)

Anfärbemittel:

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1 Rhodamin-B | :rosa |
| 2 Dipikrylamin-tauchlösung | :gelb |
| 3 Phosphorwolframsäure | :rotviolett |
| 4 Ammoniummolybdat-Perchlorsäure | :blau |
| 5 Silbernitrat | :Nur am Startpunkt schwach-braune Spur |
| 6 Ninhydrin | :keine Reaktion |

Auffallend war die positive Reaktion des Phosphatids mit Phosphorwolframsäure. Da freie Sterine nach Reinigung über einer Kieselgelsäule nicht mehr vorliegen konnten, und außerdem im Chromatogramm kein in Höhe der Fließmittelfront befindlicher Sterinfleck auftrat,

konnte angenommen werden, daß es sich bei der Chloroform-Fraktion I um eine Substanz handelt, in der Phosphorsäure und ein Sterin (evtl. Cholesterin) in gebundener Form vorliegen.

Die erfolgreiche Reinigung der Chloroform-Fraktion I war außerdem an der nur schwach auftretenden Spur in der Nähe des Startpunktes nach Behandeln mit Silbernitrat-Reagenz festzustellen (s. Abb. 16), während das ungereinigte Phosphatid einen deutlichen Fleck hinterließ (s. Abb. 14).

3.3.2 Dünnschichtchromatographie

Bei der Suche nach geeigneten Lösungsmitteln zur Dünnschichtchromatographie der Chloroform-Fraktion I erwiesen sich Chloroform/Methanol (5:1), Chloroform/Methanol (3:1) + 2% Wasser, Methanol/Äthyläther (1:1) und Chloroform/Methanol/Wasser (60:35:8) als ungeeignet. Auf den mit Ammoniummolybdat behandelten Dünnschichtplatten entstanden keine scharf abgegrenzten Flecke.

Mit dem Fließmittel Chloroform/Azeton (9:1) (135) wanderte das Phospholipoid bis zur Fließmittelfront und reagierte mit Ammoniummolybdat-, Antimon-3-chlorid- und Phosphorwolframsäurelösung (s. Abb. 17). Ein als Verunreinigung auftretendes Sterin war nach dieser Methode nicht mehr nachweisbar.



Rf 0,99

Rf 0,66

Abbildung 17

Dünnschichtchromatogramm
der Chloroform-Fraktion I

3: Cholesterin (M e r c k)
4: Chloroform-Fraktion I

Sprühareagenz: SbCl_3 -Lösung

Farbe:

Cholesterin: violett

Chloroform-Fraktion I: grün

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der kurzen Entwicklungszeit (ca. 1 Std. für eine Laufstrecke von 10 cm), so daß es für Untersuchungen während des Isolierungsvorgangs in Frage kam.

3.3.3 Papierelektrophorese

Eine weitere Prüfung des Phospholipoids auf Einheitlichkeit und Reinheit erfolgte mit Hilfe der Papierelektrophorese (s. Experimenteller Teil Seite 90). Es wurde mit Niederspannung im Boratpuffersystem pH 8,6 gearbeitet (137).

Rhodamin-B-Lösung führte zur Rosafärbung der Auftragsstelle in der Mitte des Papierstreifens. Mit Ammoniummolybdatreak-
genz entstand an gleicher Stelle eine blau gefärbte Zone. Eine Anfärbung mit Ninhydrinreagenz blieb aus. Nach Behandeln mit Silbernitratlösung waren zu beiden Seiten der Startlinie nach längerer Zeit dunkle Flecke zu erkennen, die, wie der bei der Papierchromatographie am Startpunkt auftretende Fleck (s. Abb. 14), auf eine geringe Verunreinigung der Chloroform-Fraktion I zurückzuführen sind. Das an der Startzone haftende Phospholipoid war mit Silbernitratlösung nicht anfärbbar. Es mußte geklärt werden, ob die an der Startzone befindliche, lipophile Substanz noch Zuckeranteile enthielt.

Hierzu wurden die Startzone eines Elektropherogramms, sowie die bei der PC (s. Abb. 9) mit Phosphorwolframsäure, Rhodamin-B und Ammoniummolybdat reagierende Zone (Rf-Wert 0,81) ausgeschnitten, die Papierstücke zerkleinert und in einer Mikrosoxhletapparatur mit Chloroform extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit 6n HCl (20 Std. lang bei 110°) hydrolysiert. Der hydrophile Anteil des Hydrolysates wurde pc auf Zucker geprüft (absteigendes Chromatogramm, Fließmittel : n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)). Mit Silbernitratreagenz entstanden dunkle Flecke, die die Anwesenheit von reduzierenden Substanzen andeuteten.

Hiermit konnte gezeigt werden, daß die Chloroform-Fraktion I Zucker enthält, die in chemischer Bindung vorliegen.

Ergebnis

Das aus Wollfett isolierte Phospholipoid enthält somit auf Grund der chromatographischen Untersuchungen: Phosphorsäure (Ammoniummolybdatreaktion) und Sterin (Antimon-3-chlorid- und Phosphorwolframsäurereaktion). Trotz der Anwesenheit von Stickstoff konnten mit Ninhydrin keine freien NH_2 -Gruppen nachgewiesen werden. Die Zucker müssen, da sie erst nach Hydrolyse des Phosphatids auftreten (Silbernitratreaktion), glykosidisch gebunden sein.

3.4 Untersuchung der Phosphatid-Spaltprodukte

3.4.1 Hydrophile Phosphatid-Spaltprodukte

3.4.1.1 Phosphorsäure und deren Ester

Freie Phosphorsäure war in den drei Fraktionen (Chloroform-Fraktion I, Methanol-Fraktion und ätherunlösliche Fraktion) sowohl nach saurer als auch nach alkalischer Hydrolyse nachzuweisen. Die für Phosphorsäure charakteristische Gelbfärbung erschien sofort nach dem Besprühen mit Molybdatreagenz und ging dann nach dem Erhitzen und dem Bestrahlen mit UV-Licht in Blau über.

Das Auftreten zweier, dicht beieinander liegender, mit Molybdat- und Silbernitratlösung reagierender Flecke (im wasserlöslichen Anteil der Hydrolysate der drei Fraktionen), selbst nach Erhöhen der Hydrolysezeit auf 120 Std. (6n-HCl, 110°), zeigte, daß die Phosphorsäure in der zu untersuchenden Substanzen gebunden vorliegt und sich nur schwer abspalten läßt.

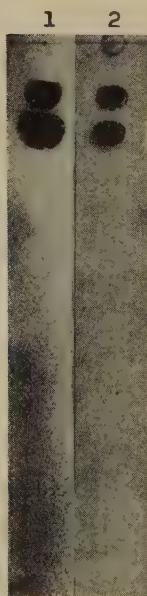


Abbildung 18

A Neutralisierter, wasserlöslicher
Anteil des Hydrolysates der äther-
unlöslichen Fraktion

B 1: Silbernitratreaktion
2: Molybdatreaktion

Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/
Wasser (4:1:1)

Laufzeit : 24 Std.

Methode : absteigend

Rf-Werte : A: 0,05

B: 0,1

Nur mit Kalilauge neutralisierte Hydrolysate wiesen pc die dicht beieinanderliegenden Flecke (mit Rf 0,05 und Rf 0,1) auf (s. Abb. 18). Gelangten saure Hydrolysate zur Chromatographie, so war der Abstand der beiden Flecke wesentlich größer. Dies ist auf die bei der Neutralisation entstehenden Salze zurückzuführen, die langsamer wandern als die freien Säuren. Die vollkommene Abspaltung der Phosphorsäure gelang mit $2n\ H_2SO_4$ (2 1/2 Std. lang bei 120°).

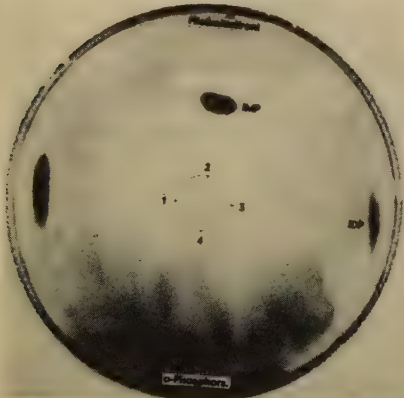
Da die nichtverseiften Phosphorsäureester auf dem PC Silbernitrat reduzierten (s. Abb. 18), kamen als Bestandteile außer der Phosphorsäure, Inosit, Glycerin und Zucker in Frage.

Inosit-mono- und Inosit-di-phosphorsäure sind als Bestandteile von Phosphatiden bekannt. Für den Nachweis und zur Abtrennung der Inositphosphorsäureester eignet sich das von S c h o r m ü l l e r und W ü r d i g (138) ausgearbeitete Verfahren, mit dessen Hilfe es möglich ist, ein Gemisch von Inositphosphorsäuren schnell und einfach zu trennen. Diesen Verfassern gelang es, auf Rundfilterpapier horizontal mit einer Lösung von Trichloressigsäure in Azeton, der eine Spur von Titriplex III (M e r c k) zugesetzt war, scharfe Trennungen zu erreichen.

Bei der PC des salzsauren Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I wurde das gleiche Verfahren angewendet. Die Isolierung der Phosphorsäureester gelang nach Partialhydrolyse ($4n\ HCl$ bei 100° , 20 Min. lang) durch Ausfällen als Bleisalze und Aufspalten mit Schwefelwasserstoff (97). Pc konnte ein Spaltprodukt der Chloroform-Fraktion I auf Grund der gleichen Wanderungsstrecke mit einer Vergleichssubstanz und des Nachweises mit Ammoniummolybdat und Silbernitrat als Inosit-di-phosphorsäure identifiziert werden (s. Abb. 19).

Abbildung 19

Rundfilterchromatogramm zur Identifizierung der Phosphorsäureester der Chloroform-Fraktion I

- 
- 1: Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I
 - 2: IMP)¹
 - 3: IDP)²
 - 4: o-Phosphorsäure

Erklärung der Abkürzungen:

- ¹ IMP = Inosit-mono-phosphorsäure
- ² IDP = Inosit-di-phosphorsäure

Da sich nach Partialhydrolyse der Chloroform-Fraktion I neben IDP keine IMP nachweisen ließ, wurde versucht, durch Veränderung der Hydrolysebedingungen (höhere Säurekonzentration, Verlängerung der Hydrolysezeit) eine bessere Esterspaltung zu erzielen und IMP pc zu bestimmen.

Zum Nachweis von IMP wurde die Chloroform-Fraktion I 8 Std. lang mit 6n HCl erhitzt (bei 100°). Zur Chromatographie gelangte das schwach saure Hydrolysat. Störend wirkte sich bei der absteigenden Methode, mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) als Fließmittel, die starke Schwanzbildung der Vergleichssubstanzen aus (s. Abb. 20).

Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob der in der Nähe des Startpunktes befindliche Fleck des Hydrolysates mit IMP identisch ist, obwohl er mit Silbernitrat und Ammoniummolybdat reagierte.

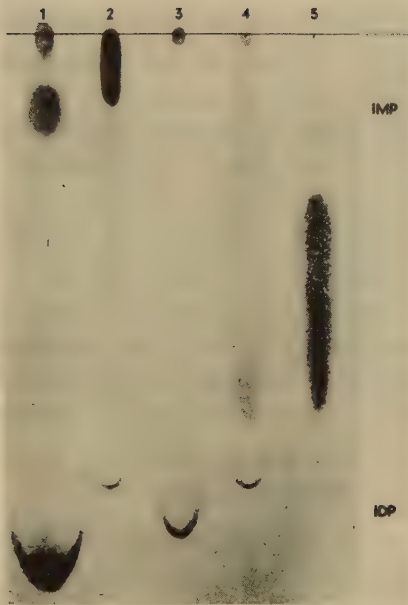


Abbildung 20

Chromatogramm des salzsauren Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I

- 1: salzsaures Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I
- 2: IMP (verunreinigt)
- 3: IDP (aus dem Ba-salz über Ionenaustauscher hergestellt)
- 4: IDP (aus dem Ba-salz durch Zusatz von H_2SO_4 und Abtrennen des $BaSO_4$ -Niederschlages² gewonnen)
- 5: o-Phosphorsäure

Sprühreagenz: Ammoniummolybdat

Methode : absteigend, Durchlaufchromatogramm
(Laufzeit: 48 Std.)

Ein exakter Nachweis von IMP in dem gleichen Hydrolysat gelang auch nicht mit der von S c h o r m ü l l e r und W ü r d i g (138) ausgearbeiteten Methode. Hierbei rief Ammoniummolybdat einen gräulichgelben Fleck hervor, der nicht die gleiche Laufstrecke zurücklegte wie IMP und IDP. Eindeutig ließ sich freie Phosphorsäure identifizieren.

Die unvollkommene Abspaltung der Phosphorsäure nach salzsaurer Hydrolyse der einzelnen Fraktionen ist durch die Stabilität des Inosit-mono-phosphorsäureesters zu erklären. Nach A n d e r s o n (139) läßt sich Phosphorsäure aus IMP nach 3 1/2-stündiger Hydrolyse mit 3%iger Schwefelsäure (bei 120°) noch nicht vollkommen abtrennen.

Die beschriebenen Untersuchungen der Spaltprodukte haben gezeigt, daß die Phosphorsäure in der Chloroform-Fraktion I, wenigstens teilweise, an Inosit gebunden (als Inosit-di-phosphat) vorliegt.

3.4.1.2 Inosit

Inosit kommt in Geweben in freier und gebundener Form vor:

als freier Inosit, bzw. als sehr labiler Ester, der durch Enzyme des Gewebes schnell gespalten wird;

in gebundener Form:

als Inositphosphorsäureester in Lipiden

als Phosphatidopeptid, wie es F o l c h nennt, das vornehmlich Inositdiphosphat enthält und mit Proteinen verbunden ist (140).

Die pc Bestimmungen erbrachten den Nachweis, daß Inosit in dem Phospholipoid des Wollfettes nicht frei, sondern an Phosphorsäure gebunden vorliegt (Nachweis von IDP im Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I). Die Identifizierung des Inosits kann deshalb nur nach Säurehydrolyse durchgeführt werden. Zur qualitativen Mikrobestimmung eignen sich zwei Methoden:

der Tüpfelnachweis von Inosit und
die Papierchromatographie.

Der Tüpfelnachweis von Inosit nach F e i g l und G e n t i l (141) beruht darauf, daß durch Eindampfen der Probelösung mit Salpetersäure Polyketone, unter ihnen Rhodizonsäure, gebildet werden, die gefärbte Ca- oder Ba-Salze ergeben.

Papierchromatographisch läßt sich Inosit nach Säurehydrolyse der zu untersuchenden Substanz von Glukose, Galaktose, Arabinose und Mannose trennen.

Das Hydrolysat der ätherunlöslichen Fraktion (s. S. 37) ergab einen positiven Tüpfeltest (Orangefärbung) auf Inosit. Aus der Chloroform- und Methanol-Fraktion war mit der Tüpfelprobe kein eindeutiger Nachweis zu erbringen.

Die Anwesenheit reduzierender Zucker wirkte sich störend aus, da diese karamelisierten und dadurch eine Farbveränderung hervorriefen.

Der Tüpfelprobe überlegen ist der pc Nachweis des Inosits mit Hilfe einer Vergleichssubstanz. Alle drei Fraktionen (s. Erklärungen zu Abb. 21) wiesen nach Hydrolyse mit

2n H₂SO₄ auf einem absteigenden PC Flecke auf (nach Behandeln mit Silbernitratlösung), deren Rf-Werte mit dem der Vergleichssubstanz Inosit (M e r c k) übereinstimmten (s. Abb. 21).

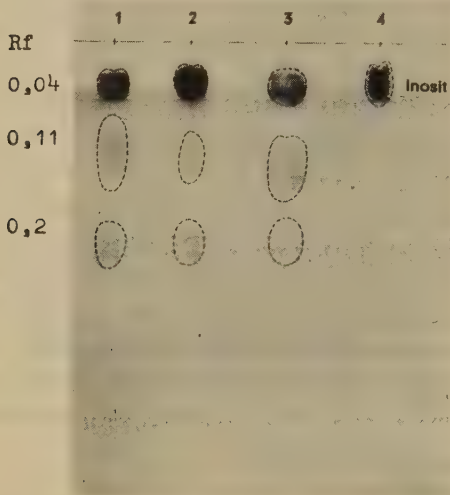


Abbildung 21

PC zur Identifizierung von Inosit

- 1: Chloroform-Fraktion I
- 2: Methanol-Fraktion
- 3: ätherunlösliche Fraktion
- 4: Inosit (M e r c k)

Methode : absteigend
(Laufzeit:
24 Std.)
Sprühlösung: Silbernitrat
Fließmittel: n-Butanol/Eis-
essig/Wasser
(4:1:1)

Inosit kann demnach als Bestandteil der Chloroform-Fraktion I, Methanol- und ätherunlöslichen Fraktion angesehen werden.

3.4.1.3 Zucker

Bei der PC zum Nachweis von Inosit (s. Abb. 21) wurden außer dem Inosit-Fleck mit Silbernitrat noch weitere dunkle Flecke beobachtet (Rf 0,11 und Rf 0,2), die auf reduzierende Stoffe (Zucker) schließen lassen. Da die drei Fraktionen (Chloroform-Fraktion I, Methanol-Fraktion und ätherunlösliche Fraktion) bzw. deren Hydrolysate (s. Abb. 21: 1, 2 u. 3) auf dem Chromatogramm die gleiche Anzahl dieser dunklen Flecke (mit gleichen Rf-Werten) aufwiesen, muß angenommen werden, daß sie die gleiche Zusammensetzung an reduzierenden Bestandteilen haben. Diese können, wenigstens bei der Chloroform-Fraktion I, nicht in freier Form vorliegen, auf Grund der negativen Reaktion des Phospholipoids mit Silbernitrat auf dem Papier (s. Abb. 16). Eine glykosidische Verknüpfung der einzelnen Zuckerkomponenten ist deshalb wahrscheinlich.

Wie K e h r (142) feststellte, besitzen Polysaccharide je nach den in ihnen vorkommenden Monosaccharidbestandteilen und deren glykosidische Verknüpfungen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Säuren. Die Wahl einer geeigneten Methode zur Säurehydrolyse ist daher für die pc Identifizierung der nach Spaltung freigewordenen Zucker ausschlaggebend.

Mit 6n HCl konnten bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, während mit 2n H₂SO₄ (Hydrolysezeit: 2 1/2 Std.) eine Aufspaltung möglich war.

Zur Chromatographie wurde bei absteigender Methode das Fließmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) verwendet. Es hat sich gezeigt, daß die bei einer Laufzeit von 24 Std. auftretenden Flecke (s. Abb. 21) bei längerer Laufzeit eine Auftrennung erfahren. In einem Durchlaufchromatogramm (Laufzeit: 120 Std.) war es möglich, in dem Hydrolysat der ätherunlöslichen Fraktion Galaktose, Glukose, Mannose und Arabinose zu identifizieren (s. Abb. 22).

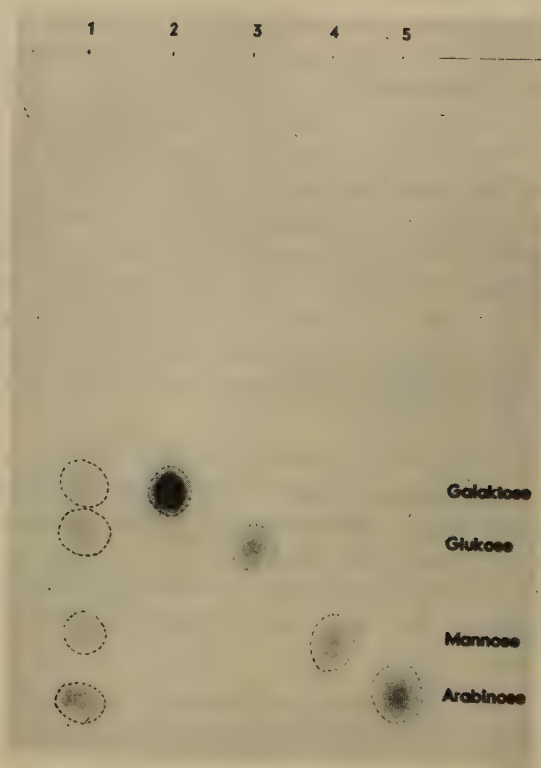


Abbildung 22

PC zum Nachweis der Zucker im Hydrolysat der ätherunlöslichen Fraktion

- 1: Hydrolysat der ätherunlöslichen Fraktion
- 2: Galaktose
- 3: Glukose
- 4: Mannose
- 5: Arabinose

Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

Methode : absteigend

Laufzeit : 120 Std. (Durchlaufchromatogramm)

Sprühlösung: Anilinphthalat

Schwierig ist nach diesem Verfahren die Trennung von Galaktose und Glukose, da diese nur mit sehr langen Laufzeiten zu erreichen ist. Eine bessere Differenzierung ist mit dem alkalischen Fließmittel n-Butanol/Pyridin/Wasser (10:3:3) möglich. Dieses Fließmittel führt jedoch nicht zur Auftrennung von Mannose und Arabinose (142).

Das verwendete Sprühmittel Anilinphthalat bietet eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Aldopentosen (Rotfärbung) und Aldohehexosen (Braunfärbung). Arabinose war auf Grund der Rotfärbung deutlich zu erkennen. Der Zuckernachweis ist am leichtesten im Hydrolysat der ätherunlöslichen Fraktion durchzuführen, da diese eine höhere Konzentration an reduzierenden Bestandteilen zu haben scheint. Störend wirkte sich der beim Neutralisieren mit Bariumkarbonat gebildete Niederschlag aus (Bariumsulfat und überschüssiges Bariumkarbonat), da hierdurch beträchtliche Zuckermengen adsorbiert und dem pc Nachweis entzogen wurden.

3.4.1.4 Aminosäuren

Ebenso wie die Zucker liegen Aminosäuren in dem Phospholipoid nicht frei vor, sondern waren erst nach Säurespaltung nachweisbar.

Die am häufigsten angewandte Methode zur vollkommenen Eiweiß- oder Peptidhydrolyse besteht im Erhitzen des Peptids mit der 30 bis 100 fachen Menge an 6n HCl bei 105° während 16-20 Std. (119).

Zum pc Nachweis der Aminosäuren wurden folgende Fließmittel verwendet:

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

Phenol/Wasser (80:20)

Phenol mit Puffer pH 12 (auf mit pH 12-Puffer imprägniertem Papier).

Bei verschiedenen Laufzeiten konnten mit Hilfe des Fließmittels n-Butanol/Eisessig/Wasser die einzelnen Aminosäuren identifiziert werden. Phenol/Wasser (80:20) trennte Serin und Asparaginsäure, die sich mit dem erstgenannten Fließmittel teilweise überdeckten. Imprägnierte Papiere (mit Puffer pH 12) und ein gepuffertes Phenol-Fließmittel führten im vorliegenden Fall zu keinem Erfolg, da eine gleichmäßige Imprägnierung des Papiers unmöglich war.

Der Anfärbung der Aminosäuren lag die bekannte Farbreaktion mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat) zu Grunde. Die entstandenen Flecke ließen sich durch Besprühen mit Kupfersalzlösung stabilisieren (136).

Die Ergebnisse der PC sicherten die Anwesenheit von Cysteinsäure, Lysin, Serin, Glutaminsäure, Alanin, Valin, Leucin und Arginin in der Chloroform-Fraktion I (s. Abb. 23-25).

Wie das Chromatogramm (Abb. 23) zeigt, tritt eine Trennung der Aminosäuren mit geringerer Wanderungsstrecke erst nach einer Entwicklungszeit von über 100 Std. ein. Da es sich um ein Durchlaufchromatogramm handelt, konnten keine Rf-Werte ermittelt werden.

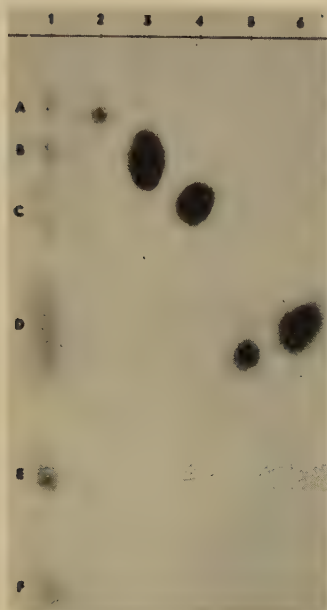


Abbildung 23

Chromatogramm zum Nachweis
der Aminosäuren im Hydrolysat
der Chloroform-Fraktion I

- 1: wasserlös. Anteil des
Hydrolysats der Chloro-
form-Fraktion I
- 2: Cysteinsäure
- 3: Lysin HCl
- 4: Arginin HCl
- 5: Asparaginsäure
- 6: Serin

Fließmittel: n-Butanol/
Eisessig/Wasser
(4:1:1)

Methode : absteigend

Laufzeit : 112 Std.
(Durchlaufchromatogramm)

Nach dieser Methode war nicht zu klären, ob Fleck D mit Asparaginsäure oder Serin bzw. mit beiden Aminosäuren identisch ist. Mit Hilfe der aufsteigenden Methode und des Fließmittels Phenol/Wasser (80:20) konnte Serin als zur Chloroform-Fraktion I gehörig ermittelt werden (s. Abb. 25). Asparaginsäure war nach diesem Ergebnis auszuschließen.

Die Aminosäuren der Methanol- und Ätherunlöslichen Fraktion wurden nicht identifiziert. Ein Chromatogramm des Hydrolysates der Ätherunlöslichen Fraktion zeigte 8 Aminosäurenflecke (s. Abb. 26), die auf eine Übereinstimmung mit denen der Chloroform-Fraktion I schließen lassen.

Rf

Abbildung 24

Chromatogramm zum Nachweis der Aminosäuren im Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I

1: wasserlösl. Anteil des Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I

2: Glutaminsäure

3: Alanin

4: Valin

5: Leucin

Fließmittel und Methode
s. Abb. 23

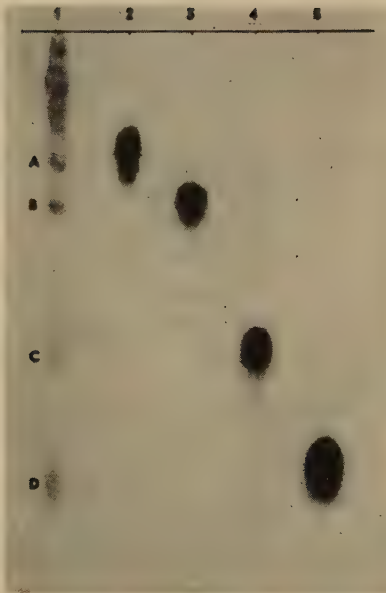
Laufzeit: 24 Std.

0,15

0,2

0,36

0,51



Die vom Startpunkt 1 bis zu Fleck A verlaufende Spur wird von den bei kurzer Laufzeit nicht trennbaren Aminosäuren (s. Abb. 23) gebildet.

Rf

Abbildung 25

Chromatogramm zum Nachweis der Aminosäuren in der Chloroform-Fraktion I

1: wasserlösl. Anteil des Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I

2: Cysteinsäure

3: Lysin HCl

4: Asparaginsäure

5: Serin

6: Glutaminsäure

Fließmittel: Phenol/Wasser
(80:20)

Methode : aufsteigend

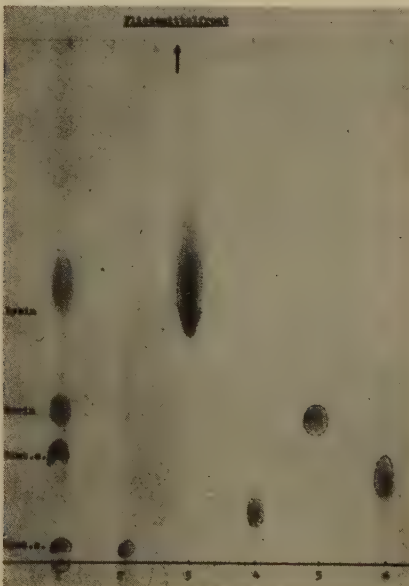
Laufzeit : 15 Std.

0,53

0,29

0,21

0,03



3.4.1.5 Prüfung auf verschiedene hydrophile Substanzen im wasserlöslichen Anteil des Hydrolysats der Chloroform-Fraktion I

Glycerin, ein Bestandteil der Glycerinphosphatide, Plasmalogene, Lysophosphatide, Mono- und Diphosphoinositide, läßt sich pc mit ammoniakalischer Silbernitratlösung nachweisen. Der wasserlösliche Anteil der Chloroform-Fraktion I nach saurer Hydrolyse (6n HCl, 20 Std. bei 110° und 2n H₂SO₄, 2 1/2 Std. bei 120°) wurde absteigend mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) entwickelt. Nach Behandeln mit ammoniakalischer Silbernitratlösung führte die Vergleichssubstanz Glycerin zu einem dunklen Fleck mit dem Rf-Wert 0,48. Das Hydrolysat wies an gleicher Stelle keinen Fleck auf und enthielt somit kein Glycerin.

Kreatinin

Es ist bekannt, daß Kreatinin im Wollschweiß vorkommt (4). Daher wurde die Chloroform-Fraktion I auf diese Verbindung (Lactam der N-Methylguanidinoessigsäure) untersucht. Nach Chromatographie eines Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I (6n HCl, 20 Std. lang bei 110°) mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) konnte Kreatinin weder mit J a f f é - noch mit S a k a g u c h i - Reagenz (119) nachgewiesen werden.

Mit J a f f é - Reagenz (alkalische Pikrinsäurelösung) erfahren Kreatinin, Glykocyamidin und Lactame der übrigen

-Guanidinsäuren, Orangefärbung. Zum Vergleich aufgetragene Kreatinin-Reinsubstanz war nach dieser Anfärbemethode deutlich erkennbar.

S a k a g u c h i - Reagenz färbt Guanidinderivate rosa bis rot. Während die Vergleichssubstanz auf dem Chromatogramm einen rosafarbenen Fleck hinterließ, führte das Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I zu keiner Anfärbung. Beide Nachweismethoden sicherten die Abwesenheit von Kreatinin in der Chloroform-Fraktion I.

Cholin, das stickstoffhaltige Spaltprodukte von Lecithin und Sphingomyelin, ist mit Dipikrylamin nachweisbar. Es erscheint auf dem Papierchromatogramm als roter Fleck auf gelbem Untergrund (119). Die pc Untersuchung des Hydrolysates der Chloroform-Fraktion I bezog sich auf die Methode

von Augustinsson und Grahn (119). Als Vergleichssubstanzen wurden ein Lecithinhydrolysat und Cholinchlorid herangezogen, die, mit n-Butanol/Äthanol/Essigsäure/Wasser (8:2:1:3) entwickelt, nach Besprühen mit Dipikrylaminlösung rote Flecke mit dem Rf-Wert 0,3 hinterließen. Das Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I enthielt nach dieser Untersuchung kein Cholin.

Neuraminsäure ist ein Bestandteil der Ganglioside und läßt sich nach Blix mit Bial's- (143) und Ehrlich's-Reagenz (144) nachweisen. Die zu erwartenden Farbreaktionen blieben bei einem Hydrolysat der Chloroform-Fraktion aus (5%ige methanolische H_2SO_4 , 6 Std. lang bei 100°). Neuraminsäure gibt mit Bial's-Reagenz eine violette und mit Ehrlich's-Reagenz nach dem Behandeln mit Alkali eine rote Farbe.

Glycerin, Kreatinin, Cholin und Neuraminsäure sind somit nicht Bestandteile der Chloroform-Fraktion I. Die Abwesenheit von Neuraminsäure deutet darauf hin, daß es sich bei der vorliegenden Substanz um kein Gangliosid handelt; die Chloroform-Fraktion I ist nach dem Ergebnis dieser Untersuchungen auch nicht als ein Sphingomyelin einzustufen (Cholin war nicht nachweisbar).

3.4.2 Lipophile Phosphatidspaltprodukte

3.4.2.1 Cholesterin

Es ist bekannt, daß Sterine nicht nur ständige Begleiter der Phosphatide sind, sondern in vielen Präparaten den Phosphatiden mehr oder weniger fest anhaften. Da die Chloroform-Fraktion I sich auf dem Papier mit Phosphorwolframsäure und Antimon-3-chlorid anfärben ließ, ist mit einem Sterin als Komponente des Phospholipoids zu rechnen. Diese Vermutung wurde ferner durch eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion bestätigt. Außerdem gelang nach Spaltung des Lipoids (mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure) eine Fällung mit Digitonin.

Der Identifizierung des Sterins mußte die Hydrolyse der Chloroform-Fraktion I vorausgehen. Es zeigte sich, daß das Verseifungsmittel von Einfluß auf den Nachweis des Sterins war. Nicht alle für die Chromatographie von Cholesterin vorgeschlagenen Methoden führten hier zum Erfolg. In einer Tabelle sind die durchgeführten Versuche zusammengefaßt.

Tabelle 10

Chromatographische Methoden zur Identifizierung
von Cholesterin in der Chloroform-Fraktion

Nr.	Chromatographie	Verseifungsmethode	Anfärbereagenz
1	Fließmittel: Essigsäure konz., aufsteigend, mit Undecan imprägniertem Papier (145)	6n HCl, 20 Std. lang bei 110°	Phosphorwolframsäure
2	s. Nr. 1 (145)	6n methanolische HCl, 20 Min. 100°	Phosphorwolframsäure
3	s. Nr. 1 (145)	5%ige methanolische Schwefelsäure 6 Std. lang bei 100°	Phosphorwolframsäure, Rubeanwasserstoffsäure und Rhodamin-B.
4	absteigend, mit Paraffinöl imprägniertem Papier Fließmittel: Eisessig/Chloroform/Paraffinöl (60:25:10) (119)	5%ige methanolische Schwefelsäure, 6 Std. lang bei 100°	Phosphorwolframsäure, Antimon-3-chlorid
5	aufsteigend, mit Undecan imprägniertem Papier Fließmittel: Essigsäure konz. (145)	n KOH (alkoholisch) 8 Std. lang bei 100°	Phosphorwolframsäure
6	Dünnschichtchromatographie Fließmittel: Chloroform/Azeton (9:1), (135)	5%ige methanolische Schwefelsäure, 6 Std. lang bei 100°	Antimon-3-chlorid
7	Dünnschichtchromatographie s. Nr. 6 (135)	Natriumäthylat 5 Std. lang bei 100°	Phosphorwolframsäure, Antimon-3-chlorid

In allen Fällen wurde der ätherlösliche Anteil des entsprechenden Hydrolysates zur Chromatographie verwendet. Nach Spaltung mit methanolischer Schwefelsäure war Cholesterin nach der aufsteigenden pc Methode (System: Undecan/Essigsäure) mit Phosphorwolframsäure nachzuweisen. In der Nähe der Fließmittelfront entstand ein rosa gefärbter Fleck, der den gleichen Rf-Wert (0,96) wie die aufgetragene Vergleichssubstanz (Cholesterin) hatte. In gleicher Höhe rief Rhodamin-B-Tauchlösung einen für Cholesterin typischen weißrosa gefärbten Fleck hervor. Das gleiche Hydrolysat führte auf einem absteigenden, mit Eisessig/Chloroform/Paraffinöl entwickelten Chromatogramm (mit Paraffinöl imprägniertem Papier) mit Antimon-3-chlorid zu einem grünen Fleck (Rf-Wert:0,83), der mit Cholesterin (Rf-Wert: 0,54) nicht identisch war. Dieses nicht eindeutige Ergebnis gab Anlaß zu weiteren Untersuchungen, zu denen sich die Dünnschichtchromatographie als erfolgversprechend anbot.

Der lipophile Anteil eines schwefelsauren Hydrolysates trennte sich dünnschichtchromatographisch mit Chloroform/Azeton (9:1) auf (s. Abb. 27).

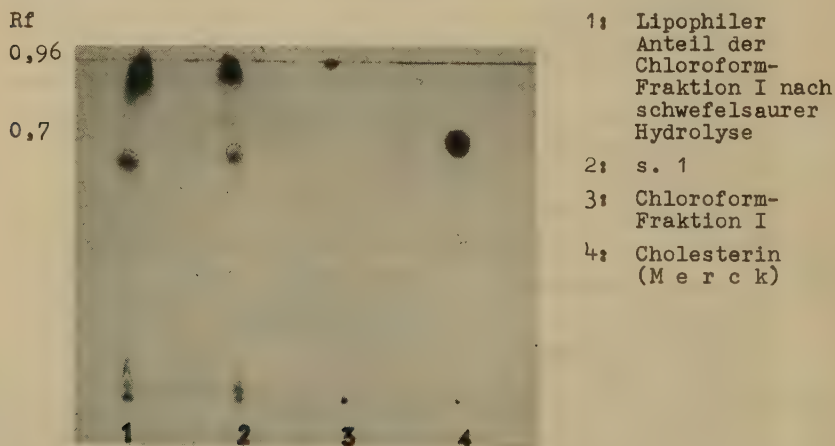


Abbildung 27

Versuch zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung des Cholesterins in der Chloroform-Fraktion I

Sprühreagenz: Antimon-3-chlorid (50%)

Fließmittel : Chloroform/Azeton (9:1)

Während ein Teil der Substanz mit der Fließmittelfront wanderte (Rf-Wert: 0,96) und mit Antimon-3-chlorid-Reagenz grün anfärbbar war, verblieb ein violetter Fleck in gleicher Höhe von Cholesterin (Rf-Wert 0,7). Grüne Flecke mit niedrigerem Rf-Wert, sowohl im Hydrolysat als auch bei Cholesterin wurden nicht identifiziert und sind wahrscheinlich auf Oxydationsprodukte zurückzuführen. Cholesterin erwies sich somit als ein Bestandteil des Phospholipoids. Es mußte noch geklärt werden, ob in der Chloroform-Fraktion I zwei Sterine (das eine davon Cholesterin) vorkommen oder ob das andere Sterin (Rf-Wert 0,96) ein während der schwefelsauren Hydrolyse entstandenes Umwandlungsprodukt von Cholesterin darstellt. Hierzu wurde Cholesterin mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure behandelt und zusammen mit den lipophilen Spaltprodukten des Phospholipoids chromatographiert (s. Abb. 28).

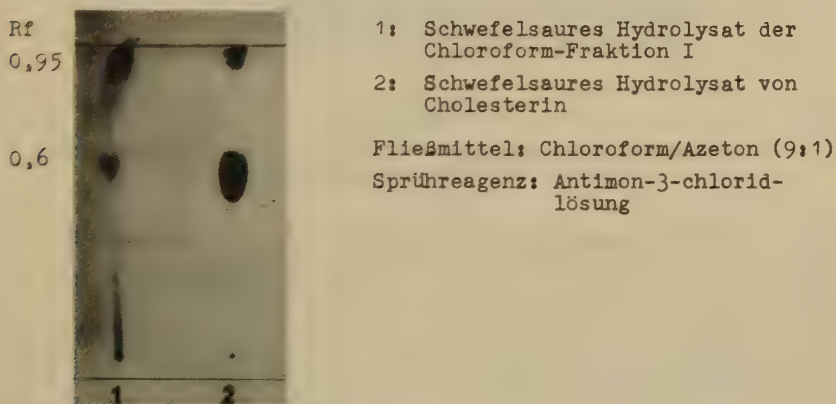


Abbildung 28

Das Dünnschichtchromatogramm zeigte, daß Cholesterin, wenn auch nur zum Teil, von methanolischer Schwefelsäure verändert wird. Die beiden zusammenliegenden, infolge der Hydrolyse entstandenen Flecke (Fließmittelfront) traten bei unbehandeltem Cholesterin nicht auf.

Da nach alkalischer Verseifung des Phosphatids mit Natriumäthylat auf einem Dünnschichtchromatogramm nur noch ein Fleck zu sehen war, der gleichen Rf-Wert (0,75) und mit Phosphorwolframsäure die gleiche Farbe (violett) wie Cholesterin hatte, stand Cholesterin als Phosphatidkomponente fest (s. Abb. 29).

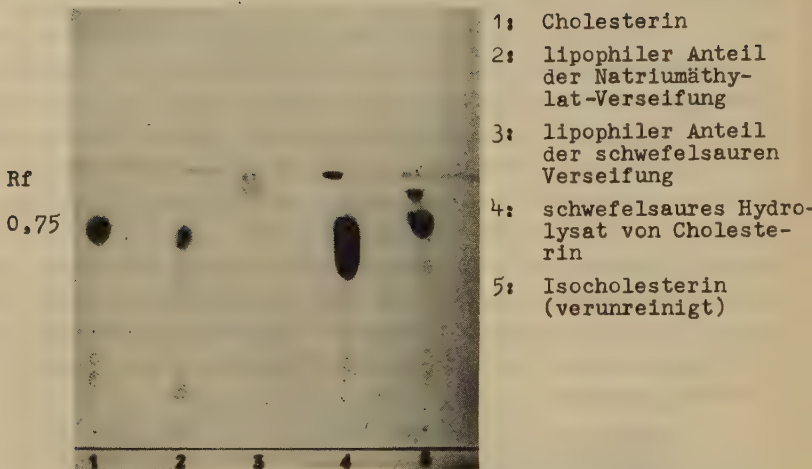


Abbildung 29

Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis von Cholesterin
in der Chloroform-Fraktion I

Die nach schwefelsaurer Hydrolyse entstandene, mit Antimon-3-chlorid grün anfärbbare Substanz der Chloroform-Fraktion I stellte ein Umwandlungsprodukt von Cholesterin dar.

Ein weiterer Identitätsbeweis beruht auf der Farbbildung bei Zugabe eines besonders zusammengesetzten L i e b e r m a n n - B u r - c h a r d - Reagenzes (146). Cholesterin zeigt bei Zimmertemperatur eine bläuliche Farbe, die im sichtbaren-Licht charakteristische Absorptionsmaxima hat. In einem Spektralphotometer wurde im Wellenbereich von 380 bis 660 m die Durchlässigkeit des mit L i e b e r m a n n - B u r c h a r d - Reagenz umgesetzten lipophilen Spaltproduktes der Chloroform-Fraktion I gemessen (s. Abb. 30).

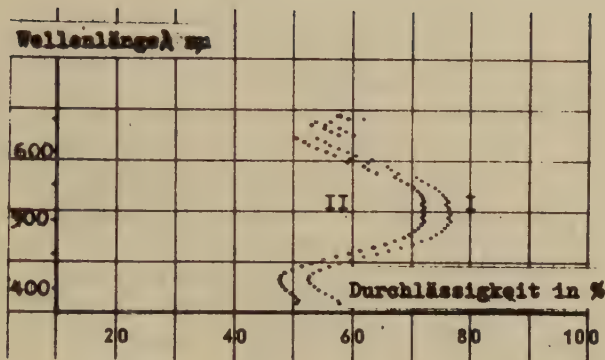


Abbildung 30

Absorptionskurven

- I Cholesterin
- II lipophiles Spaltprodukt
der Chloroform-Fraktion I

Es sollte festgestellt werden, ob die entstandene Kurve die gleichen Maxima wie die in gleicher Weise aufgestellte Kurve eines besonders gereinigten Cholesterins hatte. Die Messung erfolgte im Beckman-Spektralphotometer DU. Der parallele Verlauf beider Kurven und die gemeinsamen Maxima bei 410 $m\mu$ und 625 $m\mu$ sind ein Beweis für die Identität der lipophilen Phosphatidkomponente mit Cholesterin.

3.4.2.2 Sphingosin, ein Bestandteil der Sphingolipoide, kann nach Saito (147) mit Fluorescein-Natrium nachgewiesen werden. Auf Filterpapier entsteht nach Besprühen mit einer wäßrigen Fluorescein-Natrium-Lösung ein orangeroter Fleck.

Zum Nachweis von Sphingosin wurde die Chloroform-Fraktion I und ein Cerebrosid ⁺⁾ als Vergleichssubstanz mit methanolischer Schwefelsäure hydrolysiert und im ätherlöslichen Anteil die Fluorescein-Na-Probe durchgeführt. Beide Substanzen hinterließen einen orangefarbenen, nicht mit Wasser abwaschbaren Fleck. Da nach der positiven Reaktion mit der Anwesenheit von Sphingosin in der Chloroform-Fraktion I gerechnet werden mußte, wurde versucht, dieses aus dem Phospholipoid zu isolieren. Dem Isolierungsprozeß lag die Methode von C a r t e r und Mitarbeitern (148) zu Grunde. Nach Aufspaltung des Lipoids mit methanolischer Schwefelsäure sollten durch besondere Reinigungsverfahren die freien Sphingosinbasen mit Äther extrahiert werden. Die Fluorescein-Na-Reaktion mit der Ätherphase verlief negativ. Sphingosin konnte nach diesem Ergebnis nicht als Phosphatidkomponente in Frage kommen. Die ursprünglich positive Probe eines ungereinigten Hydrolysates war demnach nicht auf Sphingosin zurückzuführen.

⁺⁾ Herrn Priv. Doz. Dr. W a g n e r (Universität München) sei an dieser Stelle für die Überlassung von je einer Cerebrosid- und Gangliosid-Probe gedankt.

3.4.2.3 Fettsäuren lassen sich nach K a u f m a n n (145) pc trennen und nachweisen. Ihre Sichtbarmachung erfolgt durch eine Farbreaktion (Grünfärbung), der durch Eintauchen des Chromatogrammes in Kupferazetatlösung entstandenen Kupferseifen mit Rubeanwasserstoffsäure. Die ätherlöslichen Anteile nach schwefelsaurer und alkalischer Verseifung der Chloroform-Fraktion I wurden auf mit Undecan imprägniertem Papier aufsteigend mit Eisessig entwickelt. Die Rubeanwasserstoffsäure-Reaktion führte zu einem grünen Fleck am Startpunkt und zu einem auf Cholesterin zurückzuführenden grünen Fleck mit dem Rf-Wert 0,78. Das Ergebnis mit Rhodamin-Tauchlösung war das gleiche, aber mit anderem Farbeffekt (rosa gefärbter Fleck am Startpunkt und der für Cholesterin charakteristische weißrosa gefärbte Fleck mit dem Rf-Wert 0,78). Bei der am Startpunkt haftenden lipophilen Substanz dürfte es sich um einen geringen Cholesterinanteil handeln, da auch Antimon-3-chlorid eine Grünfärbung der Startzone verursachte. Nach K a u f m a n n (145) verbleiben unter gleichen Bedingungen von den höheren geradkettigen, gesättigten Fettsäuren die mit 28 und mehr C-Atomen am Startpunkt..

3.5 Infrarot-Spektroskopie

Zum qualitativen Nachweis von bestimmten Gruppen der Chloroform-Fraktion I/Methanol- und ätherunlöslichen Fraktion wurde auch die IR-Spektroskopie angewandt (s. Abb. 31). Vor allem sollte festgestellt werden, ob eine Übereinstimmung zwischen den drei Fraktionen nach dem Kurvenverlauf zu erkennen ist. Die Kurven 1 (Chloroform-Fraktion I) und 2 (Methanol-Fraktion) lassen die gleichen Absorptionsbanden erkennen und unterscheiden sich nur durch die Größe der Extinktionskoeffizienten. Die Ähnlichkeit der Chloroform-Fraktion I und Methanolfraktion steht nach diesem Ergebnis außer Zweifel. Die Kurve 3 (ätherunlösliche Fraktion) weicht von den beiden ersten ab. Die spektrale Lage der charakteristischen Absorptionsbanden soll tabellarisch wiedergegeben werden (s. Tabelle 11 u. 12).

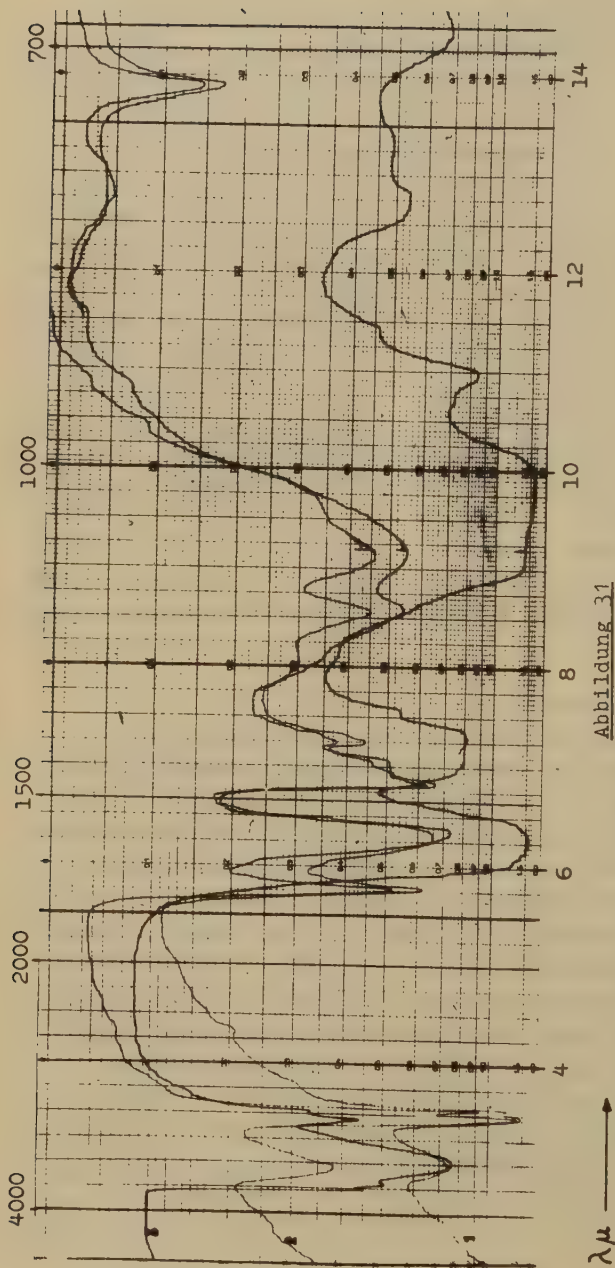


Abbildung 31

Infrarotspektrum der Chloroform-Fraktion I (Kurve 1), Methanol- (Kurve 2) und ätherunlöslichen Fraktion (Kurve 3)

KBr-Methode (5 mg Substanz auf 1 g KBr); Kurve 1 und 2 mit verstellbarem Gitter

Apparatur: Perkin-Elmer - Spektrometer mit NaCl-Prisma

Tabelle 11

Charakteristische Absorptionsbanden der Chloroform-Fraktion I, (Kurve 1) und Methanolfraktion (Kurve 2)

Wellenlängenbereich	Wellenzahlbereich cm^{-1}	Gruppe
3,0	3330	OH, NH
3,47 - 3,55	2870 - 2820	CH Doppelbande
5,76	1730	C=O
6,83	1465	CH ₂
7,25	1380	CH ₃
13,9	720	(CH ₂) _x

Tabelle 12

Charakteristische Absorptionsbanden der ätherunlöslichen Fraktion (Kurve 3), die mit Kurve 1 und 2 übereinstimmen.

Wellenlängenbereich	Wellenzahlbereich cm^{-1}	Gruppe
3,0	3330	OH, NH
3,45 - 3,52	2900-2830	CH Doppelbande

B r ü g e l (149)

Wesentlich für die Chloroform-Fraktion I und Methanolfraktion ist die Absorption bei 720 cm^{-1} , die auf die aliphatische Seitenkette des Cholesterins hinweist. Ein IR-Spektrum von Cholesterin zeigte die Absorption im gleichen Bereich. Nach W a g n e r (132) beträgt bei reinen Esterphosphatiden das Verhältnis

von OH- zu CH-Bande durchschnittlich 0,4:1. Bei Kurve 1 und 2 konnte das Verhältnis von OH- zu CH- Bande mit 0,3:1 ermittelt werden. Der Fall, daß die OH- Bande der CH- Bande hinsichtlich ihrer Intensität gleich ist, ist beim Sphingomyelin vorhanden, während bei Lysoverbindungen die Intensität der OH- Bande zu- und die der CH- Bande im gleichen Maße abnimmt. Die Carbonylbande bei 1730 cm^{-1} (Kurve 1 und 2), die auch bei Lecithin zu finden ist (132), deutet auf einen Ester hin. Das IR-Spektrum des Cholesterins hat außer der Absorption bei 720 cm^{-1} noch folgende mit Kurve 1 und 2 übereinstimmende Banden:

Absorptionsbande der OH-Gruppe

CH-Valenzschwingung

Deformationsschwingung der CH_2 - und CH_3 -Gruppe.

3.6 Besondere Eigenschaften der Chloroform-Fraktion I

Aussehen : Bräunliches Pulver

Löslichkeit: Die Substanz ist in Chloroform gut, in Äther und Benzol weniger gut löslich.

Schmelzpunkt: Der Schmelzvorgang beginnt bei 90° und ist bei 140° vollkommen beendet.

Stabilität: Mehrstündiges Erhitzen mit Methanol ist ohne Einfluß auf die Stabilität der Chloroform-Fraktion I. Es konnte danach kein freies Cholesterin nachgewiesen werden, sondern erst nach dem Verseifen mit Alkali und Säuren.

3.7 Diskussion

Das aus Wollfett isolierte Phospholipoid (Chloroform-Fraktion I) zeigte sich als eine einheitliche Substanz mit der lipophilen Gruppe: Cholesterin und den hydrophilen Komponenten: Phosphorsäure, Inosit, Zucker und Peptidanteil.

Die Aminosäuren liegen nach pc und elektrophoretischen Untersuchungen nicht frei, sondern in gebundener Form vor. Da die Zucker erst nach Spaltung des Komplexes nachweisbar sind, müssen auch diese chemisch gebunden sein (glykosidisch).

Es ist bekannt, daß komplexe Lipide außer der lipophilen Komponente einen Peptid- und Glykosidanteil enthalten können. L e d e r e r und Mitarbeiter (150) isolierten aus bestimmten Bakterienstämmen eine Substanz, die sich als ein Peptidoglykolipid erwies. Nach C o h e n (151) besteht Klarheit darüber, daß Gewebelipoproteide in der Zelle außer an Lipoiden auch komplex an Kohlenhydrate gebunden sind. R o s e n - b e r g und C h a r g a f f (152) isolierten ein Lipoid aus Rinderhirn, das ein Glykolipid in chemischer Bindung mit einem Polypeptid zu sein scheint.

Die Chloroform-Fraktion I kann auf Grund ihrer Zusammensetzung als ein Phospho-peptido-glykolipid aufgefaßt werden. Diese bisher unbekannte Bezeichnung wurde gewählt, da sie den chemischen Aufbau des aus Wollfett gewonnenen Phospholipids am besten charakterisiert.

Die Haftung von Lipoiden an Proteinen ist bei den Lipoproteinen bekannt. Als Modell der Lipoproteinstruktur wird ein Komplex aus einem Trägerprotein einerseits und einer aus Cholesterin, Cholesterinestern, Neutralfetten, Phospholipiden und Fettsäuren bestehenden gemischten Micelle andererseits angenommen, der durch elektrostatische Kräfte zusammengehalten wird (153). Über die Art der Bindung zwischen Lipoiden und Proteinen besteht noch wenig Klarheit.

M a c h e b o e u f und S a n d o r (154) vermuten, daß eine chemische Bindung zwischen Lipoid und Protein nicht vorliegt, wenn unter Einwirkung von Alkohol auf Lipoproteine der Lipoidanteil abspaltbar ist.

Die Beständigkeit des Phospho-peptido-glykolipids aus Wollfett gegenüber Methanol (nach mehrstündigem Erhitzen war kein freies Cholesterin nachzuweisen) deutet auf eine chemische Bindung (Esterbindung) zwischen Cholesterin und dem hydrophilen Anteil hin. Cholesterin konnte erst nach alkalischer und saurer Verseifung der Chloroform-Fraktion I chromatographisch ermittelt werden. Es ist denkbar, daß Cholesterin und der hydrophile Anteil der Chloroform-Fraktion I (Inosit, Zucker, Peptidanteil) über Phosphorsäure miteinander verbunden sind. Da die Phosphorsäure in der Chloroform-Fraktion I auch mit Inosit verestert ist, läßt sich der chemische Aufbau der Verbindung, wie in Abb. 32 dargestellt, erklären. Es liegt somit ein neuartiger Vertreter der großen Gruppe der Phospholipide vor.

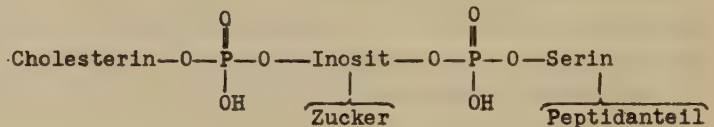


Abbildung 32

Vorschlag zum chemischen Aufbau des Phospho-peptido-glykolipids aus Wollfett

V i l k a s und L e d e r e r (156) stellten als Hauptkomponente eines Bakterienphosphatids Phosphatidyl-inositol-dimannosid fest, so daß auch die einzelnen Zucker des Wollfett-Phospholipids an Inosit gebunden sein können. Die Anwesenheit von Serin im Hydrolysat der Chloroform-Fraktion I gibt Anlaß zur Vermutung, daß dieses den Peptidanteil mit dem Rest des Moleküls vereinigt. Serinphosphorsäureester ist als Bestandteil von Phosphatiden (z.B. Phosphatidylserin) und Phosphorproteiden (z.B. Casein) bekannt.

Die Chloroform-Fraktion I und die ätherunlösliche Fraktion zeigten nach analytischen Untersuchungen in der Zusammensetzung des hydrophilen Restes Ähnlichkeit. Da nach einer abgeänderten, schonenden Isolierungsmethode kein ätherunlöslicher Rückstand neben der ätherlöslichen Fraktion verblieb, ist anzunehmen, daß der neben der Chloroform-Fraktion I auftretende ätherunlösliche Rückstand ein während des Isolierungsprozesses entstandenes Spaltprodukt des Phospho-peptido-glykolipids darstellt.

	Seite
4 <u>Experimenteller Teil</u>	80
4.1 Gewinnung des Phospholipoids aus Wollfett	80
4.1.1 Azeton-Äther-Extraktion des Rohwollfettes B	80
4.1.2 Säulenchromatographische Reinigung des ätherlöslichen Phospholipoids	81
4.1.3 Gewinnung der Chloroform-Fraktion II aus Rohwollfett B	82
4.2 Phosphorbestimmungsmethoden	82
4.2.1 Kolorimetrische Halbmikro- methode nach B e c k e r und Krull	82
4.2.2 Phosphatid-Phosphorbestimmung nach B e v e r i d g e und J o h n s o n	83
4.3 Chromatographie des Phospholipoids	89
4.3.1 Papierchromatographie	89
4.3.2 Dünnschichtchromatographie	90
4.3.3 Papierelektrophorese	90
4.4 Untersuchung der Phosphatid- Spaltprodukte	92
4.4.1 Hydrolysebedingungen	92
4.4.2 Aufarbeitung der Hydrolysate	93
4.4.3 Chromatographie der Spaltprodukte	94
4.4.3.1 Hydrophile Bestandteile	94
4.4.3.2 Lipophile Bestandteile	96
4.4.4 Chemisch-analytische Nachweis- methoden	97
4.4.4.1 Absorptionskurven von Cholesterin und des nach alkalischer Verseifung entstandenen lipophilen Spaltproduk- tes der Chloroform-Fraktion I	97
4.4.4.2 Farbreaktion nach L i e b e r m a n n - B u r c h a r d zum Nachweis von Sterinen	99
4.4.4.3 Tüpfelnachweis auf Inosit	99

4 Experimenteller Teil

Im experimentellen Teil wird die Ausführung der einzelnen Untersuchungen näher beschrieben, ohne dabei solche Methoden zu berücksichtigen, die erfolglos waren.

4.1 Gewinnung des Phospholipoids aus Rohwollfett B

Die Isolierungsmethode gliedert sich auf in: die Extraktion des Rohwollfettes B mit Azeton und anschließend mit Äther und in die säulenchromatographische Reinigung des gewonnenen ätherlöslichen Phospholipoids.

4.1.1 Azeton-Äther-Extraktion des Rohwollfettes B (s. Abb. 13)

500 g Rohwollfett B wurden in einem Zweihalskolben (6 Ltr.), versehen mit Rückflußkühler und mechanischem Rührer, mit 2 Liter kaltem Azeton etwa 4 Std. lang kräftig gerührt. Die überstehende, gelb gefärbte Azetonphase wurde dekantiert, und dieser Prozeß wurde so oft wiederholt, bis das Azeton sich nicht mehr anfärbte oder trübte (hierzu waren etwa 15 aufeinanderfolgende Extraktionsprozesse mit je 2 Litern Azeton notwendig). Diesem Verfahren schloß sich eine über 120 Std. erstreckende Extraktion des Rückstandes mit heißem Azeton in einer Soxhletapparatur an.

Die azetonunlösliche Phospholipoidfraktion (der Rückstand) wurde zur Entfernung von Sterinen in 5 Teilen Chloroform gelöst (es entstand keine klare Lösung) und mit 50 Teilen kaltem Azeton (3°) gefällt.

Eine weitere Reinigung des durch Zentrifugieren abgetrennten Präzipitats erfolgte durch vierstündiges Behandeln unter Rühren mit Äther (5 Teile Äther) in der Kälte. Es verblieb ein ätherunlöslicher Rückstand, der noch dreimal nach der gleichen Methode mit Äther behandelt wurde. Der ätherlösliche Anteil (vereinigte Ätherextrakte, s. Abb. 13) wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch gereinigt.

Das graubraune Ätherunlösliche Pulver wurde, da es sich hierbei um eine Sphingolipoid-Fraktion ⁺⁾ handeln konnte, in einer Mikrosoxhletapparatur mit Äthanol 5 Stunden lang extrahiert. Es zeigte sich, daß keine alkohollöslichen Anteile vorhanden waren.

4.1.2 Säulenchromatographische Reinigung des Ätherlöslichen Phospholipoids

Das Reinigen des Phospholipoids mit verschiedenen Lösungsmitteln geschah auf Kieselgelsäulen (Kieselgel zur Chromatographie, M e r c k , 0,2 - 0,5 mm) mit 15 mm Durchmesser und 20 cm Länge (Höhe des Adsorptionsmittels).

500 mg der Ätherlöslichen Fraktion wurden in 5 Teilen Chloroform gelöst und auf eine Kieselgelsäule gegeben. Die Elution erfolgte mit 2000 ml Azeton und war beendet, als die L i e b e r m a n n - B u r c h a r d - Reaktion im Azeton-Eluat negativ verlief. Anschließend konnte die Phospholipoid-Fraktion mit 100 ml Chloroform herausgelöst und zur weiteren Reinigung, nach dem Verjagen des Lösungsmittels auf etwa 5 ml, mit 50 ml Azeton (3⁰) ausgefällt werden. Die auf diese Weise gereinigte Substanz erhielt die Bezeichnung Chloroform-Fraktion I (s. Seite 38).

Nach dem Eluieren der Chloroform-Fraktion haftete am oberen Säulenende noch eine gelbliche Substanz, die sich mit 100 ml Methanol herauslösen und, wie bei der Gewinnung der Chloroform-Fraktion I beschrieben, mit Azeton umfällen ließ.

Die durch Umfällen mit Azeton erhaltenen Präzipitate (aus der Chloroform- und Methanol-Fraktion) wurden im Vakuumexsiccator getrocknet und zu den analytischen Untersuchungen verwendet.

⁺⁾ Sphingolipoide (Cerebroside, Cerebroside-sulfate, Sphingomyelin, Ganglioside) sind unlöslich in Äther und lassen sich nach W a g n e r (157) durch ein besonderes Verfahren (nach Äthanol-Extraktion) aus dem ätherunlöslichen Anteil der Lipide gewinnen.

4.1.3 Gewinnung der Chloroform-Fraktion II aus Rohwollfett B

Diese Methode unterscheidet sich von der angeführten (4.1.1) nur in der Durchführung der Soxhletextraktion. Der durch Behandeln mit Azeton gewonnene unlösliche Rückstand wurde nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator mit gleichen Teilen Kieselgel (zur Chromatographie, M e r c k , 0,2 - 0,5 mm) verrieben und in eine Soxhletapparatur zur weiteren Extraktion mit Azeton überführt. Der in der Hülse verbliebene, azetonunlösliche Rückstand löste sich vollkommen in Äther. Die säulenchromatographische Reinigung der azetonunlöslichen, ätherlöslichen Substanz (4.1.2) führte zur Chloroform-Fraktion II.

4.2 Phosphorbestimmungsmethoden

4.2.1 Kolorimetrische Halbmikromethode nach B e c k e r und K r u l l (105)

Diese Methode erwies sich als brauchbar, die Anreicherung des Phospholipoids im Laufe des Isolierungsprozesses zu verfolgen.

Herstellung von Molybdat-Reagenz

6,85 g Natriummolybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.a.) und 400 mg Hydrazinsulfat p.a. wurden in einem 1 Ltr. Meßkolben in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit 100 ml konzentrierter Schwefelsäure (p.a.) versetzt. Es entstand eine tiefblaue Lösung, die nach völligem Erkalten mit etwa 1/2 Ltr. Wasser weiter verdünnt, nochmals abgekühlt und zu 1 Ltr. aufgefüllt wurde.

Herstellung der Eichkurve

S t a n d a r d - P h o s p h a t - L ö s u n g e n

Lösung I : 0,5046 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ wurden in destilliertem Wasser gelöst und zu 1 Ltr. aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthielt $100 \gamma \text{P}_2\text{O}_5$.

Lösung II: 100 ml von Lösung I wurden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml verdünnt. 1 ml dieser Lösung enthielt $10 \gamma \text{P}_2\text{O}_5$.

Wechselnde Mengen der Lösung II wurden in 100 ml Meßkolben pipettiert, jeweils 0,75 g Magnesiumoxyd (p.a.), 20 ml $2n\ H_2SO_4$ und 20 ml Molybdatreagenz hinzugesetzt, mit destilliertem Wasser verdünnt und $1/2$ Std. lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde bis zur Marke aufgefüllt und die entwickelte Blaufärbung in einem Photometer (Zeiss-Elko II) gegen einen entsprechend hergestellten Blindwert (Wasser+ $MgO+2n\ H_2SO_4$ +Reagenz) gemessen (Eichkurven s. Abb. 33, 34 u. 35).

Durchführung der Bestimmung

Bis zu 1,5 g des phosphorhaltigen Materials wurden in einen Platintiegel eingewogen, mit 0,75 g MgO (p.a.) bedeckt und bis zum Schmelzen des Lipoids in einen Trockenschrank gebracht (130°). Nachdem die Masse vom Magnesiumoxyd aufgesogen worden war, wurde zunächst auf offener Flamme vorsichtig verascht und dann im Muffelofen die Asche bei 850° weiß ge-
glüht. Nach dem Abkühlen wurde der Rückstand mit etwa 30-40 ml destilliertem Wasser und 20 ml $2n\ H_2SO_4$ aufgenommen, bis zur vollständigen Lösung des Magnesiumoxyds erwärmt und in einen 100 ml Meßkolben übergeführt. Die weitere Durchführung der Bestimmung erfolgte wie bei der Herstellung der Eichkurve. Es war möglich, die Empfindlichkeit der Methode durch Verwendung größerer Küvetten (20 bis 50 mm) zu steigern.

4.2.2 Phosphatid-Phosphorbestimmung nach B e v e r i d g e und J o h n s o n (113)

Diese kolorimetrische Methode eignet sich zur Phosphorbestimmung in kleineren Phosphatidmengen und beruht auf einer nassen Veraschung des Phosphatidmaterials, die schneller durchführbar ist als diejenige mit Magnesiumoxyd.

Herstellung von Molybdat-Reagenz

Nach B o l t z und M e l l o n (158) wurden 25 ml einer Lösung von 2,5 g Natriummolybdatdihydrat (p.a.) in 100 ml $10n\ H_2SO_4$ (p.a.) und 10 ml einer Lösung von 0,15 g Hydrazinsulfat (p.a.) in 100 ml destilliertem Wasser gemischt und mit Wasser (dest.) auf 100 ml ergänzt.

Herstellung der Eichkurve

Wechselnde Mengen der Standard-Phosphatlösung II (s. Methode von B e c k e r und K r u l l , Seite 82) wurden in 50 ml Meßkolben pipettiert, mit 20 ml der frisch bereiteten Molybdatlösung versetzt und 1 ml mit 2 Tropfen Wasserstoffperoxyd versetzte Schwefelsäure ⁺) (konz., p.a.) hinzugefügt.

Die Meßkolben wurden, nachdem ihre Inhalte gut durchmischt waren, für 10 Min. ins siedende Wasserbad gestellt und nach dem Abkühlen bis zur Marke aufgefüllt. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Photometer (Zeiss-Elko II) mit 50 mm Küvetten gegen einen Blindwert (Eichkurve s. Abb. 36).

Durchführung der Bestimmung

Die in ein Mikroreagenzglas eingewogene Phosphatidsubstanz (etwa 1 mg) wurde mit 1 ml H_2SO_4 konz. über der kleinen Flamme eines Mikrobrenners 5 Min. lang erhitzt und unter Schütteln mit 2 Tropfen 30%igem Wasserstoffperoxyd (frei von P) versetzt. Das Erhitzen wurde 10 Min. lang fortgesetzt. Nach dem Abkühlen wurden etwa 5 ml Wasser zugegeben und der Inhalt des Reagenzglases mit 15 ml Wasser in einen 50 ml Meßkolben überspült. Nach dem Hinzufügen der frisch bereiteten Molybdat-Hydrazinsulfatlösung (20 ml) wurde weiterhin wie bei der Aufstellung der Eichkurve verfahren.

⁺) Eine Farbentwicklung tritt nur dann ein, wenn die Schwefelsäure mit dem Wasserstoffperoxyd zuvor auf einer Sparflamme des Bunsenbrenners erhitzt wird (zum Zerstören des Wasserstoffperoxyds).

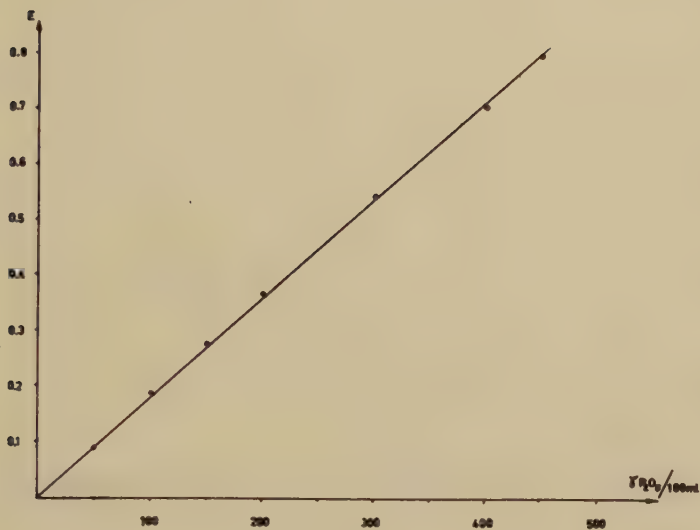


Abbildung 33

Eichkurve zur Halbmikro-Phosphat-Bestimmung,
gemessen im Zeiss-Elko II-Photometer
(10 mm Küvette, Filter S 75)

Methode nach B e c k e r und K r u l l (105)

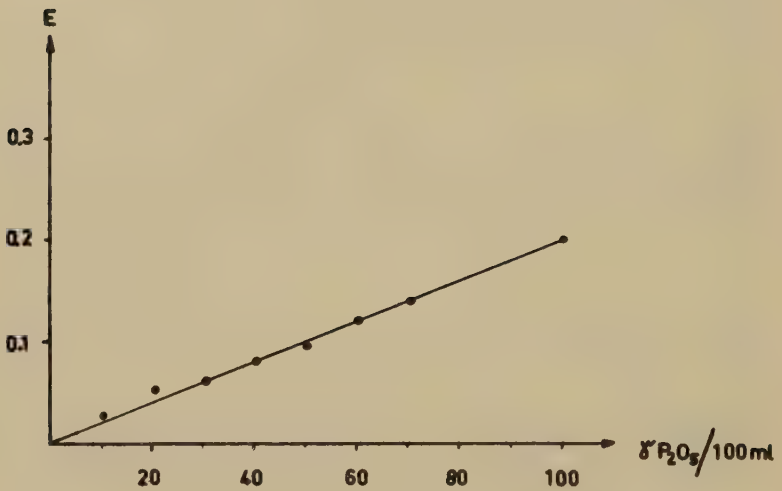


Abbildung 34

Eichkurve zur Halbmikro-Phosphat-Bestimmung,
gemessen im Zeiss-Elko II-Photometer
(20 mm Küvette, Filter S 75)

Methode: s. Abb. 33

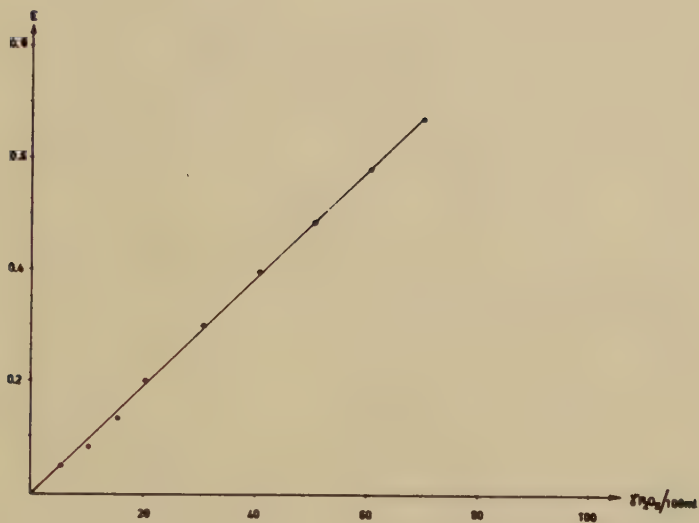


Abbildung 35

Eichkurve zur Halbmikro-Phosphat-Bestimmung,
gemessen im Zeiss-Elko II-Photometer
(50 mm Küvette, Filter S 75)

Methode: B e c k e r und K r u l l (105)

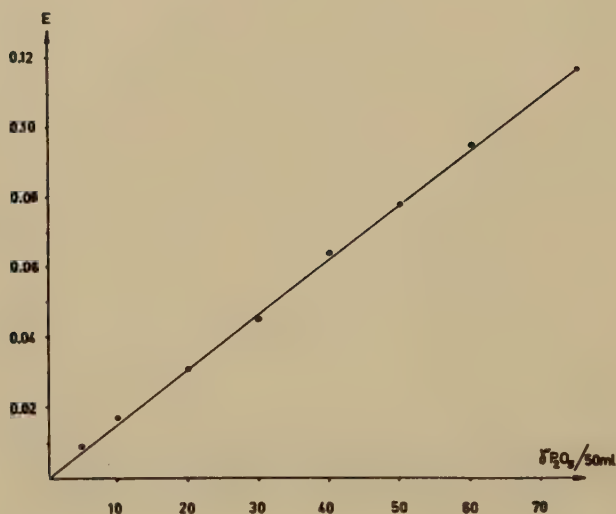


Abbildung 36

Eichkurve zur Phosphatid-Phosphor-Bestimmung
nach B e v e r i d g e und J o h n s o n (113)
gemessen im Zeiss-Elko II-Photometer
(50 mm Küvette, Filter S 75)

4.3 Chromatographie des Phospholipoids

4.3.1 Papierchromatographie

Zur Durchführung der Papierchromatographie wurden Papiere der Firma Schleicher und Schüll benutzt und die entwickelten Chromatogramme mit verschiedenen Sprüh- und Tauchlösungen behandelt (Zusammensetzung s. Seite 89ff). Die Versuchsbedingungen sind der folgenden Aufstellung zu entnehmen:

Ausführung der Versuche

Vorbereitung der Proben:	Lösen des Phospholipoids in Chloroform (1%ige Lösung) und auftragen
Ausführungsform	: aufsteigende Methode
Papier	: Schleicher und Schüll 2043 b, Mg1
Fließmittel	: Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6)
Entwicklungszeit	: 4 Std.
Trocknen des Papieres	: im Kaltluftstrom

Reagenzien zum Sichtbarmachen des Phospholipoids

Rhodamin-B - Lösung: Das Chromatogramm wurde 25 Min. lang in eine 0,005%ige wäßrige Rhodamin-B-Lösung gelegt, anschließend gut mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen im Tages- und UV-Licht betrachtet (Farbreaktionen s. Tabelle 9).

Ammoniummolybdatlösung: 3 g Ammoniummolybdat wurden in 255 ml Wasser (dest.) gelöst und die Lösung mit 30 ml n HCl und 15 ml Überchlorsäure (60%) versetzt.

Die mit Ammoniummolybdat besprühten Chromatogramme wurden 10 Min. lang einer Temperatur von 90° ausgesetzt und bis zum Auftreten blauer Flecke mit ungefiltertem UV-Licht behandelt (etwa 20 Min.).

Phosphorwolframsäurelösung: Eine 10%ige Phosphorwolframsäurelösung in Äthanol lieferte bei Erhitzen der besprühten Chromatogramme auf 110° (10 Min.) Rotviolett-Färbung.

Antimon-3-chloridlösung: Die Chromatogramme wurden mit 50%iger Antimon-3-chloridlösung in Eisessig besprüht und etwa 5 Min. lang auf 110° erhitzt.

Dipikrylamin-Tauchlösung: 1 Liter Wasser und 50 ml einer gesättigten Dipikrylaminlösung (in 10%iger Natriumkarbonatlösung, gesättigt) wurden gemischt und als Tauchlösung für Chromatogramme verwendet. Der überschüssige Farbstoff der Chromatogramme wurde nach 10 Min. langem Eintauchen mit fließendem Wasser ausgewaschen, bis der Papieruntergrund wieder entfärbt war.

4.3.2 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Prüfung des Phospholipoids auf Begleitstoffe erfolgte auf Glasplatten (22 x 20 cm), die mit einer Kieselgel-G-Anreibung bestrichen waren. Zum Bestreichen einer Platte wurden 10 g Kieselgel-G (M e r c k) mit 33 ml destilliertem Wasser angerieben und mit Hilfe eines Streichers gleichmäßig auf die Glasplatte aufgetragen. Nach dem Trocknen der Adsorptionsschicht (30 Min. lang bei 105°) waren die Platten verwendungsfähig. Das in Chloroform gelöste Phospholipoid (1%ige Lösung) wurde 1,5 cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen und in einer Glaskammer mit dem Fließmittel Chloroform/Azeton (9:1) entwickelt. Die Entwicklungszeit betrug, je nach Kammersättigung, etwa 1 Std.

Zum Sichtbarmachen konnten wie bei der PC Antimon-3-chlorid-, Phosphorwolframsäure- und Ammoniummolybdatlösung benutzt werden (s. S. 89 u. 90).

4.3.3 Papierelektrophorese

Zur papierelektrophoretischen Prüfung auf Verunreinigungen der Chloroform-Fraktion I fand die Elektrophoresekammer (Elphor H) nach G r a s s m a n n und H a n n i g (159) Verwendung. Die Arbeitsbedingungen waren die folgenden:

Ausführung der Versuche:

Vorbereitung der Proben:	Lösen der <u>Chloroform-Fraktion I</u> in Chloroform (0,1%ige Lösung)
Auftragen der Lösung	: mit Hilfe einer Mikropipette, welche an der Ausflußstelle stumpf war (um ein Anrauen der Papierfaser zu vermeiden) über eine Strecke von 3 cm (Papiermitte)
Papier	: Filtrierpapierstreifen (31,4 x 3,4 cm), Schleicher u. Schüll 2043a, Mgl
Puffer	: Boratpuffer vom pH 8,6 (enthält im Liter 8,80 g Natriumborat und 4,65 g Borsäure)
Spannung	: 3,5 V/cm
Entwicklungszeit	: 7 Std.

Die Papierstreifen (mit der aufgetragenen, getrockneten Substanz) wurden mit Pufferlösung gleichmäßig benetzt und noch feucht in die Kammer eingelegt, so daß die beiden Enden in die Pufferflüssigkeit eintauchten.

Das am Startpunkt zurückbleibende Phospholipoid war mit Rhodamin-B- und Ammoniummolybdatlösung (s. S. 89) sichtbar zu machen. Auf freie NH_2 -Gruppen wurde mit Ninhydrin-Reagenz ¹⁾ und auf als Verunreinigung auftretende Zucker mit Silbernitratlösung ²⁾ geprüft.

1) Ninhydrinlösung:

0,2 g Ninhydrin wurden in 95 ml Methanol gelöst und der Lösung 5 ml Collidin zugesetzt. Die besprühten Chromatogramme wurden 1 Std. bei 80° erwärmt. Da die mit Ninhydrin erzeugten Farbflecke nur beschränkt haltbar sind, wurden sie mit Kupferreagenz fixiert. Zu 1 ml gesättigter, wässriger Kupfernitratlösung wurden 0,2 ml 10%ige Salpetersäure und 3 ml dest. Wasser gegeben. Im Meßkolben wurde mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Die besprühten Chromatogramme wurden bei 80° getrocknet.

2) Silbernitratlösung:

2,5%ige Lösung von Silbernitrat in Methanol. Die Chromatogramme wurden nach dem Besprühen 1 Std. lang Ammoniakdämpfen ausgesetzt und anschließend 10 Min. lang bei 100° erhitzt.

Nachbehandlung: Fixieren mit 10%iger Natriumthiosulfatlösung und wässern.

4.4 Untersuchung der Phosphatid-Spaltprodukte

Der Untersuchung der Spaltprodukte der Chloroform-Fraktion I, Methanol-Fraktion und Ätherunlöslichen Fraktion mit Hilfe von chromatographischen und chemisch-analytischen Methoden ging die Hydrolyse der entsprechenden Substanz voraus. Die Hydrolysebedingungen richteten sich nach den zu identifizierenden Spaltprodukten. So wurden zum Beispiel für die Bestimmung von Aminosäuren die einzelnen Fraktionen nach dem für Eiweiß und Peptide vorgesehenen Verfahren hydrolysiert.

4.4.1 Die Hydrolysebedingungen sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13

Nachzuweisende Substanzen	Verseifungsmittel	Temp. in °C	Dauer der Hydrolyse
Inosit-di-phosphorsäure	4n HCl	100°	20 Min.
Inosit-mono-phosphorsäure	6n HCl	110°	8 Std.
Inosit	2n H ₂ SO ₄	120°	2 1/2 Std.
Phosphorsäure	6n HCl	110°	20 Std.
	n KOH (alkohol.)	100°	8 Std.
Zucker	2n H ₂ SO ₄	120°	2 1/2 Std.
Aminosäuren	6n HCl	110°	20 Std.
Cholesterin	Natrium-äthylat	100°	5 Std.
	5%ige methanolische Schwefelsäure	100°	6 Std.
Fettsäuren	n KOH (alkohol.)	100°	8 Std.
	5%ige methanolische Schwefelsäure	100°	6 Std.

Die Substanzen wurden mit der Verseifungsflüssigkeit (5 - 10 mg Substanz/2 ml Verseifungsflüssigkeit) in Glasröhrchen eingeschmolzen und im Trockenschrank unter öfterem Umschütteln bei der angegebenen Temperatur hydrolysiert. Bei alkoholischen Flüssigkeiten wurde das Erhitzen am Rückflußkühler (Wasserbad) vorgezogen.

4.4.2 Aufarbeitung der Hydrolysate

Salzsaure Hydrolysate: Das Hydrolysat wurde mit Wasser verdünnt, die lipophilen Bestandteile durch Ausschütteln mit Äther und Abtrennen der Ätherphase entfernt und der wäßrige Anteil mehrmals im Vakuum auf dem Wasserbad eingeeengt (durch Versetzen des Eindampfdruckstandes mit Wasser und Wiederholen des Eindampfens).

Ein großer Teil der Salzsäure konnte nach diesem Verfahren entfernt werden. Die restliche Salzsäure wurde im Vakuum-exsiccator über Kaliumhydroxyd abgezogen. Dieses jetzt nur noch schwach sauer reagierende Hydrolysat fand für pc Untersuchungen Verwendung. Die pc Ergebnisse wiesen Veränderungen auf, wenn das Hydrolysat im Gegensatz zur beschriebenen Methode mit n KOH neutralisiert wurde (s. S. 51).

Isolierung des Inosit-di-phosphorsäureesters nach partieller, salzsaurer Hydrolyse (4n HCl, 20 Min.)

Der lipophile Anteil des Hydrolysates wurde nach dem Erkalten durch Filtration entfernt und das Filtrat wiederholt im Vakuum eingedampft (nach Zugabe von Wasser). Der Rückstand wurde in etwa 5 ml Wasser gelöst, die Lösung mit n KOH und verdünnter Perchlorsäure auf pH 6 eingestellt und das ausgefallene Kaliumperchlorat abzentrifugiert. Mit einem Überschuß von 25%iger wäßriger Bleiazetatlösung konnte Inosit-di-phosphorsäureester als Bleisalz ausgefällt werden. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in eine wäßrige Suspension des Bleisalzes wurde Inosit-di-phosphorsäure in Freiheit gesetzt. Die filtrierte Lösung war für pc Bestimmungen verwendbar.

Schwefelsaure Hydrolysate

Der mit Wasser verdünnte, hydrophile Anteil des schwefelsauren Hydrolysates wurde nach dem Entfernen der ätherlöslichen Bestandteile mit Bariumkarbonat neutralisiert, die dickflüssige Masse in einem Porzellantiegel abgesaugt und mit dest. Wasser ausgewaschen. Das im Vakuum eingeeengte Filtrat wurde zur Pc benutzt.

Alkalische Hydrolysate wurden mit verdünnter Perchlorsäure neutralisiert und das ausgefallene Kaliumperchlorat abgetrennt.

Natriumäthylatverseifung ¹⁾

Zur Bestimmung von Cholesterin erfolgte die Verseifung der Chloroform-Fraktion I mit Natriumäthylat (10 mg Substanz auf 10 ml Natriumäthylat). Das mit Wasser verdünnte Hydrolysat wurde mit Äther ausgeschüttelt. In der Ätherphase war dünnschichtchromatographisch Cholesterin nachzuweisen.

4.4.3 Chromatographie der Spaltprodukte

4.4.3.1 Hydrophile Bestandteile

Die Chromatographie der wasserlöslichen Substanzen erfolgte, mit Ausnahme von Phosphorsäure und Inosit-di-phosphorsäure, auf Schleicher und Schüll-Papier Nr. 2043b, Mgl. Zur Untersuchung von Phosphorsäure und Inosit-di-phosphorsäure wurde Schleicher und Schüll-Papier Nr. 2045b, G1 verwendet. Die nach 4.4.2 aufgearbeiteten Hydrolysate wurden mit den in Tabelle 14 zusammengestellten Fließmitteln entwickelt und mit Ammoniummolybdat-, Silbernitrat, Ninhydrin- und Anilinphthalatreagenz ²⁾ besprüht.

1) Natriumäthylat zur Verseifung der Chloroform-Fraktion I wurde aus 25 ml absolutem Alkohol und 1,5 g Na-Metall bereitet.

2) Anilinphthalatsprühlösung: 0,93 g Anilin und 1,66 g o-Phthalsäure wurden in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst und die mit Anilinphthalatlösung besprühten Chromatogramme 10 Min. lang bei 105° erhitzt.

Tabelle 14

Nr. Stoffgruppe	Fließmittel	Methode	Laufzeit	Auftrennung bzw. Nachweis von	Sprühreagenz
1 Phosphorsäure	Azeton (74 ml), 0,1 m Titriplex III-Lösung (1 ml) und 25%ige Tri- chloroessigsäu- re (25 ml)	Rundfil- terchro- matogramm (138)	15 Std.	Phosphorsäure	Molybdat- lösung
2 Inosit-di- phosphorsäure	s. Nr. 1	s. Nr. 1	s. Nr. 1	Phosphorsäure und Inosit	Molybdat- und Silbernitrat- lösung
3 Inosit-mono- phosphorsäure		absteigend	48 Std. (Durchlauf)		
4 Inosit	n-Butanol/ Eisessig/ Wasser (4:1:1)	absteigend	24 Std.	Inosit und Zucker	Silbernitrat- lösung
5 Zucker		absteigend	120 Std. (Durchlauf)	Galaktose, Glukose, u. Mannose u. Arabinose	Anilinphtal- atlösung
6 Aminosäu- ren		absteigend	112 Std. (Durchlauf)	Cysteinsäure, Lysin, Arginin, Serin	Ninhydrinlösung und Kupferni- tratlösung (zum Stabilitä- sieren der Flecke)
			24 Std.	Glutaminsäure, Alanin, Valin, Leucin	
			15 Std.	Cysteinsäure, Glutaminsäure, Serin, Lysin	
	Phenol/Wasser (80 : 20)	aufstei- gend			

Durchführung der Rundfiltermethode zum Nachweis von Phosphorsäure und Inosit-di-phosphorsäure

Als Chromatographierkammer diente ein Steingutgefäß mit passendem Exsiccatordeckel (innerer Durchmesser: 24 cm, äußerer Durchmesser: 28 cm). Das Lösungsmittel befand sich in einer Petrischale. Vor dem Gebrauch wurde ein kreisförmiger Papierbogen (S c h l e i - c h e r u. S c h ü l l , 2043b, G1) zugeschnitten (28 cm Durchmesser) und in seinen Mittelpunkt ein Kreis von 4 cm Durchmesser als Startlinie eingezeichnet, in dessen Zentrum das Verteilungsmittel durch einen aus 2 x 6 cm großen Filtrierpapierstreifen gewickelten Docht zugeführt wurde.

Jeweils eine Stunde vor dem Ansatz des Chromatogrammes wurde zu 74 ml frisch dest. Azeton 1 ml einer 0,1 m wässrigen Lösung von Titriplex III (M e r c k) gegeben und anschließend mit 25%iger Trichloressigsäurelösung auf 100 ml aufgefüllt. Zum Entwickeln eines Rundfilterchromatogramms reichten etwa 30 ml Verteilungsmittel aus.

Die Gewinnung der freien Inositphosphorsäuren als Vergleichssubstanzen aus ihren Bariumsalzen ¹⁾ war mit Hilfe des Kationenaustauschers Amberlite IR-120 möglich. Die Ionenaustauschersäulen wurden mit dem entsprechenden Bariumsalz beladen und die freien Säuren (Inosit-mono- und Inosit-di-phosphorsäure) mit 0,2n HCl ausgewaschen. Zur Chromatographie gelangten die im Vakuum eingeeengten Eluate.

4.4.3.2 Lipophile Bestandteile

Auf lipophile Bestandteile (Fettsäuren und Cholesterin) wurde im ätherlöslichen Hydrolyseanteil geprüft.

Fettsäure: Der pc Prüfung auf Fettsäuren lag die von K a u f m a n n und M a k u s (145) ausgearbeiteten Methode zu Grunde. Die Ätherphasen der Chloroform-Fraktion I (nach schwefelsaurer und alkalischer Verseifung) wurden aufsteigend auf mit Undecan imprägniertem Papier (S c h l e i c h e r u. S c h ü l l , 2043b,

¹⁾ Herrn Prof. Dr. J. Schormüller (Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität Berlin) danken wir für die bereitwillige Überlassung von Bariumsalzen verschiedener Inositphosphorsäuren.

Mgl) mit Eisessig entwickelt (Entwicklungszeit 24 Std.,).

Die an der Luft getrockneten Chromatogramme wurden 30 Min. lang in eine 0,2%ige wäßrige Lösung von Kupferazetat getaucht, anschließend eine Std. lang in strömendem Leitungswasser, dann dreimal mit dest. Wasser gewaschen und 25 Min. lang bei 100° getrocknet. Die getrockneten Chromatogramme wurden mit 0,3%iger äthanolischer Rubearwasserstoffsäurelösung besprüht. Fettsäuren hinterlassen nach dieser Methode dunkelgrüne Flecke auf weißem Hintergrund.

Cholesterin ließ sich papier- und dünnschichtchromatographisch nachweisen.

Das zum pc Nachweis von Fettsäuren angewandte Verfahren (System: Undecan/Eisessig) war auch für die Bestimmung von Cholesterin brauchbar. Nach dem Trocknen der Chromatogramme konnte das Lipoid mit Rhodamin-B- Tauchlösung und Phosphorwolframsäurereagenz identifiziert werden.

Die Dünnschichtchromatographie von Cholesterin zeigte sich wegen der kürzeren Entwicklungszeit der pc Methode überlegen. Der nach der Hydrolyse der Chloroform-Fraktion I verbliebene lipophile Anteil wurde auf Dünnschichtplatten (Herstellung s. S.90) mit Chloroform/Azeton (9:1) entwickelt.

Antimon-3-chlorid- und Phosphorwolframsäurelösung wurden zur Anfärbung der Substanz benutzt.

4.4.4 Chemisch-analytische Nachweismethoden

4.4.4.1 Absorptionskurven von Cholesterin und des nach alkalischer Verseifung entstandenen lipophilen Spaltproduktes der Chloroform-Fraktion I

Zur Aufstellung der Kurven wurden Cholesterin (das Oxydationsprodukte als Verunreinigung enthielt) und der ätherlösliche Anteil, der nach alkalischer Verseifung der Chloroform-Fraktion I entstand, dünnschichtchromatographisch gereinigt. Die auf Dünnschichtplatten aufgetragenen Substanzen wurden mit Chloroform/Azeton (9:1) entwickelt (Laufstrecke 10 cm) und am Rand der Platten die Lage der

Flecke mit Antimon-3-chlorid-Reagenz kenntlich gemacht. Nach dem Abkratzen der Kieselgelschicht in Höhe des Cholesterinflecks (R_f 0,75) konnte Cholesterin mit Chloroform p.a. (wasserfrei) herausgelöst werden.

10 ml der Proben, die etwa 1 bis 2 mg Sterin in Chloroform gelöst enthielten, wurden mit 5 ml L i e b e r m a n n - B u r c h a r d - Reagenz ¹⁾ versetzt und 25 Min. lang in ein Wasserbad bei 20° (unter Lichtabschluß) eingestellt. Gleichzeitig mit den Untersuchungslösungen wurde unter denselben Bedingungen im Schüttelzylinder eine Blindprobe angesetzt, die an Stelle der Sterinlösung Chloroform enthielt. Die Messung erfolgte im B e c k m a n - S p e k t r a l p h o t o m e t e r DU in 10 mm Küvetten mit Hilfe eines elektronischen Kompensationsschreibers.

1) Herstellung von L i e b e r m a n n - B u r c h a r d - Reagenz (146):

2 ml eisgekühlter konzentrierter Schwefelsäure (p.a.) wurden vorsichtig im Eisbad mit 8 ml eisgekühltem Essigsäureanhydrid versetzt. Nach etwa 10 Min. erfolgte der Zusatz von 5 ml Eisessig p.a. ($d = 1,005 - 1,008$) sowie 5 ml Dioxan p.a. Nach Ablauf von 5 Min. wurde die Reagenzlösung, die sich in einem Schüttelzylinder befand, gemischt. Sie war nach weiteren 5 Min. gebrauchsfertig.

4.4.4.2 Farbreaktion nach Liebermann - Burchard
zum qualitativen Nachweis von Sterinen (114)

10 mg des Sterins wurden in 3 ml Chloroform gelöst und 2 ml des Liebermann - Burchard - Reagenzes hinzugegeben. Nach Brieskorn und Herrig (114) ist die Reaktion als positiv anzusprechen, wenn eine Farbfolge von Rot über Violett nach Grün auftritt.

Herstellung des Liebermann - Burchard -
Reagenzes:

1 ml konzentrierte Schwefelsäure wurde tropfenweise unter Umschütteln mit 20 ml Essigsäureanhydrid vermischt und das Reagenz verschlossen aufbewahrt.

4.4.4.3 Tüpfelnachweis auf Inosit (141)

Ein Tropfen der wäßrigen Probelösung (wasserlöslicher Anteil des schwefelsauren Hydrolysates) wurde mit einem Tropfen Salpetersäure (d 1,4) vermischt, auf einer Tüpfelplatte eingetrocknet, der Rückstand mit einem Tropfen 5%iger Kalziumchloridlösung und einem Tropfen Ammoniak (d 0,9) behandelt und dann die Tüpfelplatte auf 180° erhitzt. Die Reaktion ist positiv, wenn nach 5 - 10 Min. eine rote bis braunrote Färbung auftritt.

5 Zusammenfassung

Nach Extraktion mit Azeton und anschließend mit Äther gelang die Anreicherung eines phosphorhaltigen Lipoids in Wollfett, dessen Reinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie möglich war. Insgesamt wurden drei Fraktionen erhalten: ätherunlösliche-, Chloroform-Fraktion I und Methanol-Fraktion. Die Ähnlichkeit (bzw. Identität) der Chloroform-Fraktion I mit der Methanol-Fraktion konnte durch übereinstimmende Absorptionsbanden im Infrarot-Bereich festgestellt werden. Die Chloroform-Fraktion I erwies sich als eine einheitliche Substanz, die auf Grund ihrer Zusammensetzung als ein Phospho-peptido-glykolipid bezeichnet werden kann. Diese bisher unbekannte Formulierung erschien angebracht, da sie den Spaltprodukten des Phospholipoids aus Wollfett am besten gerecht wird. Diese wurden nach saurer und alkalischer Hydrolyse pc identifiziert. Der hydrophile Anteil der Verbindung besteht aus: Phosphorsäure, Inosit, einem Peptidanteil (Cysteinsäure, Lysin, Arginin, Serin, Glutaminsäure, Alanin, Valin und Leucin) und Zuckern (Galaktose, Glukose, Mannose und Arabinose). Das lipophile Spaltprodukt ist Cholesterin. Da der Nachweis von Cholesterin erst nach Verseifung der Chloroform-Fraktion I gelang, lag die Vermutung nahe, daß zwischen dem hydrophilen und dem lipophilen Anteil des Phospholipoids eine chemische Bindung besteht. Ein weiterer Hinweis für eine chemische Bindung war die Beständigkeit der Substanz gegenüber Methanol (nach mehrstündigem Erhitzen mit Methanol war kein freies Cholesterin nachzuweisen).

Der ätherunlösliche Rückstand, der kein Cholesterin enthielt, zeigte in seiner Zusammensetzung Ähnlichkeit mit dem hydrophilen Rest der Chloroform-Fraktion I und ist zunächst als ein während des Isolierungsprozesses entstandenes Spaltprodukt des Phosphopeptido-glykolipids aufzufassen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) A. H. Warth, The Chemistry and Technology of Waxes, Reinhold Publishing Corporation, New York (1956)
- (2) M. Chevreuil, Compt. rend. 42, 120 (1856)
- (3) J. C. Drummond, J. Soc. chem. Ind. 48, 232T (1929)
L. C. Baker,
- (4) G. Senft, Dissertation, Frankfurt a.M. (1956)
- (5) P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1961)
- (6) W. R. Bloor, Chem. Reviews 2, 243 (1925)
C. A. 19, 3278 (1925)
- (7) J. A. Lovern, The Chemistry of Lipids of Biochemical Significance, Methuen & Co LTD, London, John Wiley & Sons, Inc., New York (1957)
- (8) J. Folch, Annu. Rev. Biochem. 17, 147 (1948)
W. M. Sperry,
- (9) H. P. Kaufmann, Analyse der Fette und Fettprodukte, Bd. I, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)
- (10) H. J. Deuel, The Lipides, Vol. I, Interscience (1951)
- (11) D. J. Hanahan, Lipide Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York (1960)
- (12) J. L. W. Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere, Tübingen (1901)
- (13) K. Bloch, Lipide Metabolism., John Wiley & Sons, Inc., New York (1960)
- (14) H. Wittcoff, The Phosphatides, Reinhold Publishing Corporation, New York (1951)
- (15) J. M. R. Beveridge, Can. J. Biochem. and Physiol. 34, 361 (1956)
J. M. R. Beveridge Can. J. Biochem. and Physiol.
und Mitarb., 34, 441 (1956)
- (16) R. M. C. Dawson, Biol. Rev. Cambridge philos. Soc. 32, 188 (1957)
R. M. C. Dawson, Biochem. J. 65, 627 (1957)
T. Mann,
I. G. White,
- (17) E. P. Kennedy, Annu. Rev. Biochem. 26, 119 (1957)
- (18) J. Folch, Annu. Rev. Biochem. 17, 147 (1948)
W. M. Sperry

- (19) M. C. Pangborn, J. biol. Chemistry 168, 351-361 (1947)
- (20) M. Gobley, J. Pharmac. Chim. 2, 1, 81, 161 (1846)
- (21) E. Baer,
M. Kates, J. biol. Chemistry 175, 79 (1948)
- (22) J. L. W. Thudichum, A Treatise on the Chemical Constitution
of the Brain, London, Baillière,
Tindall & Cox (1884)
- (23) J. Folch,
H. A. Schneider, J. biol. Chemistry 137, 51 (1941)
- (24) J. Folch, J. biol. Chemistry 138, 973 (1941)
- (25) J. Folch, J. biol. Chemistry 174, 439 (1948)
- (26) A. C. Chibnall,
H. J. Channon, Biochem. J. 23, 1, 176 (1929)
- W. Diemair,
A. Mührdel, Die Nahrung 2, 5 (1958)
- (27) D. J. Hanahan,
I. L. Chaikoff, J. biol. Chemistry 172, 191 (1948)
- (28) M. C. Pangborn, J. biol. Chemistry 143, 247 (1942)
- 153, 343 (1944)
- 168, 351 (1947)
- (29) R. J. Anderson, J. Amer. chem. Soc. 52, 1607 (1930)
- C. A. 24, 2490 (1930)
- (30) R. J. Anderson,
J. Cason, J. biol. Chemistry 126, 527 (1938)
- (31) J. Folch,
D. W. Woolley, J. biol. Chemistry 142, 963 (1942)
- (32) J. Folch, J. biol. Chemistry 146, 35 (1942)
- (33) J. Folch, J. biol. Chemistry 177, 497, 505 (1949)
- (34) J. N. Hawthorne, Biochim. biophysica Acta 18, 389 (1955)
- (35) J. Folch,
F. N. Le Baron Can. J. Biochem. and Physiol.
34, 305 (1956)
- (36) H. E. Carter,
W. D. Celmer,
W. E. M. Lands,
K. L. Muller,
H. H. Tomizawa, J. biol. Chemistry 206, 213 (1954)
- (37) H. E. Carter,
R. H. Gigg,
J. H. Law,
T. Nakayama,
E. Weber, J. biol. Chemistry 233, 1309 (1958)
- (38) J. N. Hawthorne, Biochim. biophysica Acta 18, 389-393
(1955)
- (39) J. N. Hawthorne,
E. Chargaff, J. biol. Chemistry 206, 27 (1954)
- (40) D. W. Woolley, J. biol. Chemistry 147, 581 (1943)
- (41) J. Folch, Federation Proc. 6, 252 (1947)

- (42) T. Malkin, J. chem. Soc. (London) 3470 (1953)
A. G. Poole,
- (43) C. R. Schoolfield, J. Amer. Oil Chemists' Soc.
H. J. Dutton, 29, 293 (1952)
R. J. Dimler,
- (44) E. Vilkas, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 111 (1956)
E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 1013 (1960)
- (45) H. E. Carter, J. biol. Chemistry 169, 77 (1947)
W. J. Haines,
W. E. Ledyard,
W. P. Norris,
- (46) P. A. Levene, J. biol. Chemistry 18, 453 (1914)
J. biol. Chemistry 24, 69 (1916)
- (47) H. E. Carter, J. biol. Chemistry 145, 709 (1942)
W. P. Norris,
- (48) S. J. Thannhauser, J. biol. Chemistry 172, 141 (1948)
N. F. Boncoddó,
- (49) H. E. Carter, J. biol. Chemistry 206, 613 (1954)
W. D. Celmer,
W. E. M. Lands,
K. L. Muller,
H. H. Tomizawa,
- (50) K. L. Muller, University of Illinois (1953)
- (51) R. Feulgen, Pflügers Arch. ges. Physiol.
K. Voit, 206, 390 (1924)
- (52) E. Klenk, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
H. Debuch, 296, 179 (1954)
299, 66 (1955)
H. Debuch, Fette-Seifen-Anstrichmittel
62, 639 (1959)
H. Debuch, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
304, 109 (1956)
- (53) H. Magistris, Biochem. Z. 210, 85 (1929)
C. A. 23, 4956 (1929)
- (54) J. Hölzl, Dissertation, Universität München (1959)
- (55) E. Klenk, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
273, 76 (1942)
- (56) G. Blix, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
240, 43 (1936)
- (57) G. Blix, Acta Soc. med. Upsaliensis
E. Lindberg, 61, 1 (1956)
L. Odín,
I. Werner
- (58) G. Blix, Acta chem. scand. 6, 358 (1952)
L. Svennerholm,
I. Werner,
- (59) L. Odín, Acta Soc. med. Upsaliensis
I. Werner, 52, 230 (1952)

- (60) F. Zilliken, Arch. Biochem. Biophysics
G. A. Braun, 54, 564 (1955)
P. György,
- (61) R. Kuhn, Chem. Ber. 87, 123 (1954)
R. Brossmer,
- (62) R. Kuhn, Chem. Ber. 89, 2471 (1956)
R. Brossmer,
- (63) R. Kuhn, Liebigs Ann. Chem. 616,
R. Brossmer, 221 (1958)
- (64) T. Yamakawa, J. Biochemistry (Tokyo)
S. Suzuki, 38, 199 (1951)
- (65) T. Yamakawa, J. Biochemistry (Tokyo)
S. Suzuki, 39, 175 (1952)
- (66) G. Blix, Nature (London) 179, 1088 (1957)
A. Gottschalk,
E. Klenk,
- (67) J. W. Cornforth, Proc. chem. Soc. 25 (1957)
M. E. Daines,
A. Gottschalk,
- (68) R. J. Winzler, in Methods of Biochemical Analysis, Vol. II
Interscience Publishers, New York,
London S. 296
- (69) G. Blix, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
219, 82 (1933)
- (70) T. Nakayama, J. Biochemistry (Tokyo)
38, 157 (1951)
- (71) S. J. Thannhauser, J. biol. Chemistry 215, 211 (1955)
J. Fellig,
G. Schmidt,
- (72) J. Folch, J. biol. Chemistry 191, 833 (1951)
J. Ascoli,
M. Lees,
J. Meath,
F. N. Le Baron,
- (73) J. Folch, J. biol. Chemistry 226, 497 (1957)
M. Lees,
G. H. Sloane Stanley
- (74) J. Folch, Federation Proc. 18,
G. R. Webster, 228 (1959)
M. Lees,
- (75) C. G. Huggins, J. biol. Chemistry 234,
D. V. Cohn, 257 (1959)
- (76) F. N. Le Baron, in Biochemistry of Lipids,
E. E. Rothleder, Pergamon Press (1960)
- (77) E. Klenk, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.
R. Rennkamp, 267, 145 (1940)
- (78) J. M. Mc Kibbin, J. biol. Chemistry 220, 2 (1956)
- (79) M. B. Lees, in Methods in Enzymology Vol. III,
Academic Press Inc., Publishers
New York (1957) S. 338

- (80) J. N. Hawthorne, Biochim. biophysica Acta 18, 389 (1955)
- (81) J. Folch, J. biol. Chemistry 146, 35 (1942)
- (82) J. Hölzl, J. biol. Chemistry 177, 497 (1949)
Lit.-Stelle (54)
- (83) E. van Handel, The Chemistry of Phosphoaminolipids, Amsterdam (1954)
- (84) E. Fourneau, Bull. Soc. Chim. biol. 11, 805 (1913)
Piettre, C. A. 7, 803 (1913)
- (85) H. Roth, Angew. Chem. 53, 273 (1940)
P. Schuster, C. A. 35, 493 (1941)
- (86) Fischer, C. A. 2, 2429 (1908)
- (87) K. Lang, HoppeSeyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl. Bd. III. 2. Teil, Springer Verlag S. 922
E. Lehnartz,
G. Siebert,
- (88) Lit.-Stelle (87), S. 921
- (89) Lit.-Stelle (87), S. 930
- (90) M. Schofield, C. A. 39, 1999 (1945)
A. A. Horvath, C. A. 31, 8970 (1937)
J. chem. Educat. 14, 424 (1937)
- (91) M. Kumagawa, Biochem. Z. 8, 212 (1908)
K. Suto, C. A. 2, 2560 (1908)
- (92) W. R. Bloor, J. biol. Chemistry 82, 273 (1929)
- (93) W. R. Bloor, J. biol. Chemistry 17, 377 (1914)
- (94) L. O. Pilgeram, J. biol. Chemistry 216, 465 (1955)
D. M. Greenberg,
- (95) C. P. Stewart, Biochem. J. 29, 1683 (1935)
E. B. Hendry, C. A. 29, 7360 (1935)
- (96) L. F. Salisbury, J. biol. Chemistry 129, 505 (1939)
R. J. Anderson,
- (97) K. Nielsen, Studies on the non-hydratable Phosphatides, Kopenhagen (1956), Maxson & Co. Ltd., London, S. 23
- (98) H. Hadorn, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 43, 1 (1952)
R. Jungkunz,
- (99) H. Bollmann, C. A. 17, 3234 (1923)
B. Rewald, C. A. 27, 4706 (1933)
- (100) B. Rewald, Oil and Soap 21, 50 (1944)
C. A. 38, 2226 (1944)
- (101) M. Mashino, C. A. 27, 4704 (1933)
- (102) K. Nielsen, in Lit.-Stelle (97), S. 79
- (103) J. Folch, J. biol. Chemistry 146, 35 (1942)
J. biol. Chemistry 174, 439 (1948)

- (104) H. Debuch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 109 (1956)
- (105) E. Becker, Fette-Seifen-Anstrichmittel
L. Krull, 60, 447 (1958)
- (106) E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium,
Verlag Chemie, Weinheim (1955)
- (107) M. Kates, Canad. J. Botany 35, 895 (1957)
F. M. Eberhardt,
- (108) J. M. Mc Kibbin, J. biol. Chemistry 220, 537 (1956)
- (109) G. V. Marinetti, Federation Proc. 16, 837 (1957)
J. Erbland,
J. Kochen,
- (110) D. J. Hanahan, J. biol. Chemistry 228, 685 (1957)
J. C. Dittmer,
E. Warashina,
- (111) B. Borgstrom, Acta physiol. scand. 25,
101, 111 (1952)
- (112) G. La Roche, Dissertation, Universität Washington
(1956)
- (113) J. M. R. Beveridge, Z. analyt. Chem. 132, 196 (1951)
S. E. Johnson, Canad. J. Res., Sect. E 27
159 (1959)
- (114) C. H. Brieskorn, Arch. Pharmaz. 292/64, 495 (1959)
H. Herrig,
- (115) J. Kjeldahl, Z. analyt. Chem. 22, 366 (1883)
- (116) T. H. Bevan, J. chem. Soc. (London) 1951, 841
G. I. Gregory,
T. Malkin,
A. G. Poole,
- (117) D. Amelung, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 298, 199 (1954)
F. Böhm,
- (118) R. G. Witter, Arch. Biochem. Biophysics 68,
15 (1957)
G. V. Marinetti, Fette-Seifen-Anstrichmittel
A. Morrison, 60, 235 (1958)
L. Heicklin,
- (119) I. M. Hais, Handbuch der Papierchromatographie,
K. Macek, Bd. I, G. Fischer Verlag, Jena (1958)
- (120) L. Douste-Blazy, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 27
J. Polonovsky, (1956)
P. Valdigue,
- (121) U. Beiss, Z. Naturforsch. 13b, 79 (1958)
O. Armbruster,
- (122) O. W. Thiele, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 306, 185 (1957)
H. Bergmann,
- (123) C. H. Lea, Biochem. J. 60, 353 (1955)
D. N. Rhodes,
R. D. Stoll,
C. H. Lea, Biochem. J. 52, V (1955)
D. N. Rhodes,

- (124) G. V. Marinetti, Federation Proc. 16,
J. Erbland, 837 (1957)
J. Kochen,
- (125) J. W. Dieckert, J. Amer. Oil Chemist's Soc.
R. Reiser, 33, 535 (1956)
- (126) M. Brown, Analytic. Chem. 29, 30 (1957)
D. A. Yeadon,
L. A. Goldblatt,
J. W. Dieckert,
- (127) L. Hörhammer, Biochem. Z. 331, 155 (1959)
H. Wagner, Z. analytic. Chem. 173, 344
G. Richter, (1960)
- (128) I. G. Kirchner, Analytic. Chem. 23, 420
I. M. Miller, (1951)
G. I. Keller,
- (129) E. Stahl, Chemiker-Ztg. 10, 323 (1958)
- (130) H. Weicker, Klin. Wschr. 37, 763 (1959)
- (131) H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol.
Chem. 320, 134 (1960)
- (132) H. Wagner, Fette-Seifen-Anstrichmittel
62, 1118 (1960)
- (133) E. Stahl, Pharmaz. Rundschau 1, Nr. 2, 1 (1959)
- (134) M. Barbier, Helv. chim. Acta 42, 2440 (1959)
u. Mitarb.,
- (135) D. Waldi, (Fa. E. Merck, Darmstadt) im Druck
- (136) Chromatographie, E. Merck,
Darmstadt, II. Aufl.
- (137) Ch. Wunderly, Die Papierelektrophorese,
II. Auflage, Verlag Sauerländer & Co,
Aarau und Frankfurt /M. (1959)
- (138) J. Schormüller, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forschg.
G. Würdig, 105, 397-403 (1957)
- (139) R. J. Anderson, J. biol. Chemistry 18, 441 (1914)
- (140) U. Friedel, Dissertation, Freie Universität
Berlin (1960)
- (141) F. Feigl, Mikrochim. Acta (Wien) 1955,
V. Gentil 1004-1007
Z. analyt. Chem. 153, 320 (1956)
- (142) W. Kehr, Dissertation, Frankfurt a.M. (1960)
- (143) G. Blix, Skand. Arch. Physiol. 80,
46, (1938)
- (144) G. Blix, Hoppe-Seyler's Z. physiol.
Chem. 240, 43 (1936)
- (145) H. P. Kaufmann, Fette-Seifen-Anstrichmittel
Z. Makus, 62, 153 (1960)

- (146) H. Janecke,
G. Senft, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland
96, 433 (1957)
- (147) K. Saito, J. Biochemistry (Tokyo) 47,
573 (1960)
- (148) H. E. Carter,
W. E. Norris,
F. J. Glick,
G. E. Phillips,
R. Harris, J. biol. Chemistry 170, 269 (1947)
- (149) W. Brügel, Einführung in die Ultrarotspektros-
kopie, Steinkopff-Verlag, Darmstadt
(1954)
- (150) E. Lederer, Chemistry of Natural Products,
Intern. Symposium, Australia (1960),
Butterworths London, S. 601
- (151) P. P. Cohen, Chemistry of Lipides as related to
Atherosclerosis, Symposium compiled
and edited by Irvine H. Page, M. D.,
Charles C Thomas Publisher,
Springfield, Illinois, S. 95
- (152) A. Rosenberg,
E. Chargaff, Biochim. biophysica Acta 21,
588 (1956)
- (153) N. Zöllner, Dtsch. med. Wschr. 83, 448 (1958)
- (154) M. A. Macheboeuf,
G. Sandor, Bull. Soc. Chim. biol. 14, 1168 (1932)
- (155) H. v. Euler, Ber. dtsch. chem. Ges. 60, 1720 (1927)
- (156) E. Vilkas,
E. Lederer, Lit.-Stelle (44)
- (157) H. Wagner, in Lit.-Stelle (132), S. 1120
- (158) D. F. Boltz, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit.
19, 873 (1947)
- (159) W. Grassmann,
K. Hannig, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
290, 1 (1952)

Lebenslauf

Am 17. Juli 1933 wurde ich, Werner Fülberth, als Sohn des Buchbinder-Werkmeisters Georg Fülberth und seiner Ehefrau Marie, geb. Roller, in Darmstadt geboren. Ich besuchte sechs Jahre lang die Grundschule und ab Herbst 1946 bis zur Ablegung der Reifeprüfung im Februar 1953 die Realgymnasiale Aufbauschule Darmstadt (in Traisa). Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Paracelsus-Apotheke in Darmstadt bestand ich im März 1955 die Pharmazeutische Vorprüfung. Im Sommersemester 1955 begann ich das Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und legte im Frühjahr 1958 die Pharmazeutische Prüfung ab. Anschließend war ich sechs Monate lang in der Apothekenpraxis tätig. Im Wintersemester 1958/59 setzte ich meine naturwissenschaftlichen Studien an der Johann Wolfgang Goethe-Universität fort. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Frühjahr 1959. Nach einer vertieften analytisch-chemischen Ausbildung fertigte ich am Pharmazeutischen Institut der Universität unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Janecke meine Dissertation an. Seit Juli 1960 verwalte ich am gleichen Institut die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten.

Meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Janecke, fühle ich mich für die Anregungen und Unterstützungen bei dieser Arbeit zu tiefem Dank verpflichtet.

Dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes, meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. C. Rohmann, danke ich aufrichtig für sein stets freundliches Entgegenkommen und für die Förderung in persönlicher Hinsicht.

